

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen



Mog-Bel 198/07

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité  
Biologique

Mémoire de Magister en Biologie  
Option : Biochimie appliquée

**THEME**

**Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques des  
bactéries à Gram négatif non hétérofermentaires au  
niveau du CHU de Sidi Bel Abbes**

Présenté par

*M<sup>elle</sup> SEFRAOUI Imane*

Devant le jury composé de

<b>Présidente</b>	<b>M<sup>me</sup> HASSAINE H.</b>	<b>Maître de conférences, Université de Tlemcen</b>
<b>Promoteur</b>	<b>M<sup>r</sup> DRISSI M.</b>	<b>Maître de conférences, Université de Tlemcen</b>
<b>Examinatrice</b>	<b>M<sup>me</sup> BOUCHERIT Z.</b>	<b>Maître de conférences, Université de Tlemcen</b>
<b>Examineur</b>	<b>M<sup>r</sup> ABDELOUAHID D.E</b>	<b>Professeur, Université de Tlemcen</b>



**Année Universitaire : 2010-2011**

## REMERCIEMENTS

*Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire « Antibiotiques, Antifongiques: Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique » de l'Université*

*Abou Bekr Belkaid -Tlemcen-*

*Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mon Promoteur M<sup>r</sup> DRISSI M, Maître de Conférences à l'Université Abou Bekr Belkaid, qui m'a guidé et orienté tout au long de mon travail. Je le remercie pour son dévouement, son aide, son soutien moral et matériel, et pour tous ses conseils qui mon beaucoup aider dans ma formation scientifique.*

*Je remercie également*

*M<sup>me</sup> HASSAINE H, Maître de Conférences à l'Université Abou Bekr Belkaid, qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury.*

*M<sup>me</sup> BONCHERIT Z, Maître de Conférences à l'Université Abou Bekr Belkaid, pour avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce travail.*

*M<sup>r</sup> ABDELOUAHID D.E, Professeur à l'Université Abou Bekr Belkaid, pour avoir bien voulu accepter de faire partie du jury et d'examiner ce travail.*

*Mes remerciements s'adressent également à*

*M<sup>r</sup> RAHMOUN N, Ingénieur au laboratoire « Antibiotique, Antifongique ».*

*Docteur BADSI AMIR S, Médecin anesthésiste, Maître assistante au CHU de Sidi Bel Abbes, qui nous a chaleureusement accueilli au service de réanimation et qui nous a fourni toute l'aide et les facilités nécessaires pour effectuer des prélèvements dans les meilleurs conditions.*

*La dynamique équipe d'infirmiers du service de réanimation pour leur aide et leur soutien.*

*Professeur BENHANDOUZ, de son amabilité pour nous avoir ouvert grande les portes du service de chirurgie du CHU de Sidi Bel Abbes.*

*M<sup>r</sup> MAACHOU, Responsable des infirmiers du service de chirurgie du CHU de Sidi Bel Abbes, pour son précieux soutien, son dévouement et son aide indispensable à la réussite de nos prélèvements.*

*M<sup>r</sup> HAMZA, Microbiologiste au laboratoire du CHU de Sidi Bel Abbes, pour sa précieuse aide et son entière dévouement à la science.*

*Ainsi que tout le personnel administratif et médical du CHU de Sidi Bel Abbes qui nous ont soutenus et aidés de près ou de loin pour la réussite de ce travail.*

## DEDICACES

*Je dédie cet ouvrage*

*A*

*Mes chers parents,*

*qui m'ont toujours fort encouragé et aidé dans la recherche du savoir durant  
tout mon parcours avec beaucoup de tendresse de dévouement de gentillesse et  
d'amour*

*Ma petite sœur Nihel,*

*Mes frères Mohamed Hadi et Salah Eddine, pour leur amour et soutien moral*

*Mes grands parents ainsi que mes oncles et tantes pour leurs encouragements  
et conseils*

*Mes amies Djahida, Meriem, Samia, Amel, Kamila pour leur aide et soutien*

*Ainsi que toute l'équipe du laboratoire « Antibiotiques, Antifongiques ».*

## Partie II : MATERIELS ET METHODES

1. Matériels.....	28
1.1 Matériel biologique.....	28
1.2 Milieux de culture.....	28
1.3 Tests biochimiques.....	28
1.4 Solutions et Tampons.....	29
1.5 Antibiotiques.....	29
2. Méthodes.....	30
2.1 Prélèvements.....	30
2.2 Isolement et Purification.....	30
2.3 Identification.....	30
2.4 Antibiogramme .....	33
2.5 Détermination des CMI en milieu solide.....	35
2.6 Test à la cloxacilline.....	36
2.7 Test de synergie.....	37
2.8 Test de Hodge.....	38
2.9 Test d'EDTA.....	39
2.10 Conjugaison.....	40
2.11 Exctraction de l'ADN plasmidique.....	41
2.12 Electroohorèse de l'ADN plasmidique.....	42

## Partie III : RESULTATS ET DISCUSSION

1. Résultats.....	44
1.1 Prélèvements.....	44
1.2 Souches identifiées.....	44
1.3 Sensibilité aux antibiotiques.....	47
1.3.1 <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	47
1.3.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	48
1.4 Phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines.....	50
1.4.1 <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	50
1.4.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	53

1.5 Résistance associées chez les souches d' <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	55
1.6 Transfert d'antibiorésistance.....	56
1.7 Visualisation des plasmides sur gel d'agarose.....	57
2. Discussion.....	59
<b>Conclusion.....</b>	<b>63</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>64</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>82</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Structure chimique des $\beta$ -lactamines.	06
<b>Figure 2.</b> Structure de quelques antibiotiques aminosides.	07
<b>Figure 3.</b> Structure de base des quinolones et de la ciprofloxacine.	08
<b>Figure 4.</b> Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle $\beta$ -lactame.	17
<b>Figure 5.</b> Disposition des antibiotiques selon le schéma de Vedel 1995.	35
<b>Figure 6.</b> Schéma d'une image de synergie.	37
<b>Figure 7.</b> Lecture du test de Hodge.	39
<b>Figure 8.</b> Répartition des bacilles à gram négatif isolés à partir des prélèvements.	45
<b>Figure 9.</b> Répartition des BGNfs en fonction des services	45
<b>Figure 10.</b> Répartition des BGNfs en fonction des sites de prélèvement.	46
<b>Figure 11.</b> Répartition de <i>P.aeruginosa</i> et <i>A.baumannii</i> à partir des prélèvements de patients.	46
<b>Figure 12.</b> Répartition de <i>P.aeruginosa</i> et <i>A.baumannii</i> à partir des prélèvements de l'environnement.	47
<b>Figure 13.</b> Taux de résistance aux $\beta$ -lactamines des souches d' <i>Acinetobacter baumannii</i> .	47
<b>Figure 14.</b> Taux de résistance aux Aminosides et fluoroquinolones des souches d' <i>Acinetobacter baumannii</i> .	48
<b>Figure 15.</b> Taux de résistance aux $\beta$ -lactamines des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	49
<b>Figure 16.</b> Taux de résistance aux Aminosides et Fluoroquinolones des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	50
<b>Figure 17.</b> Répartition des phénotypes de résistance des souches d' <i>Acinetobacter baumannii</i> .	51
<b>Figure 18.</b> Résultat du test à la cloxacilline.	51
<b>Figure 19.</b> Résultat du test de synergie.	52
<b>Figure 20.</b> Résultat du test de Hodge.	52
<b>Figure 21.</b> Résultat du test à l'EDTA.	53

<b>Figure 22.</b> Répartition des phénotypes de résistance des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux $\beta$ -lactamines.	<b>54</b>
<b>Figure 23.</b> Image d'antagonisme chez une souche de phénotype perte OprD.	<b>54</b>
<b>Figure 24.</b> Image de l'induction de la céphalosporinase par l'acide clavulanique.	<b>55</b>
<b>Figure 25.</b> Phénotype de résistance d'un transconjugant.	<b>56</b>
<b>Figure 26.</b> Visualisation des plasmides sur gel d'agarose.	<b>58</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Phénotypes de résistance non enzymatique de <i>P. aeruginosa</i> .	16
<b>Tableau 2.</b> Correspondance entre la classification d'Ambler et la classification de Bush.	19
<b>Tableau 3.</b> Phénotypes de résistances d' <i>A. baumannii</i> aux $\beta$ -lactamines.	24
<b>Tableau 4.</b> Phénotypes de résistance enzymatique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux $\beta$ -lactamines.	25
<b>Tableau 5.</b> Répartition des prélèvements en fonction des services et des sites de prélèvement.	44
<b>Tableau 6.</b> Intervalles de CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) observés pour chacun des phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines.	50
<b>Tableau 7.</b> Profils de la résistance aux aminosides et aux fluoroquinolones d' <i>Acinetobacter baumannii</i> .	56
<b>Tableau 8.</b> Résultats de CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) obtenus pour les transconjugants.	57

# *Introduction*

## *Introduction*

La résistance bactérienne aux antibiotiques est apparue rapidement après leur introduction dans le traitement des maladies infectieuses. Une antibiothérapie inadaptée initialement entraîne une augmentation du risque de résistances bactériennes (Kang et al. 2005) et la dissémination des souches multi-résistantes.

Les bacilles à Gram négatif non fermentants (BGNfs) sont des bactéries aérobies strictes, caractérisées par un mode de production énergétique ne faisant pas intervenir la fermentation. Ce sont des bactéries pathogènes opportunistes responsables essentiellement d'infections nosocomiales.

Ces BGNfs sont capables de résister à de nombreux antibiotiques grâce à une membrane externe peu perméable et au développement de nombreux mécanismes de résistances ( $\beta$ -lactamases, céphalosporinases, imperméabilité sélective ou non en relation avec les porines, modification des protéines liant la pénicilline, modification d'affinité de certaines enzymes...) pouvant s'associer (Philippon. 1998) et rendant selon les cas leur mise en évidence très difficile.

Une meilleure connaissance des mécanismes de résistances et de leur traitement pourrait améliorer le pronostic des patients et diminuer la pression de sélection des antibiotiques mais aussi prévenir ou ralentir la diffusion des souches multirésistantes.

Cette étude a pour but :

- L'isolement et l'identification d'une collection de bacilles à gram négatif non fermentants isolés à partir de divers services au niveau du CHU de Sidi Bel Abbes ;
- L'évaluation des profils de résistance des souches isolées vis-à-vis des antibiotiques ;
- La détermination des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines ;
- L'analyse du support génétique de l'antibiorésistance.

# *Synthèse bibliographique*

### 1. Les Antibiotiques

Les antibiotiques sont des molécules capables d'inhiber la croissance ou même de tuer les bactéries, sans affecter l'hôte (cellules eucaryotes) (Tulkens et Spinewine, 2002). Il existe sept classes majeures d'antibiotiques bactériens utilisés en milieu clinique : les  $\beta$ -lactames, les glycopeptides, les aminoglycosides, les tétracyclines, les macrolides, les quinolones et les sulfonamides (Nukaga et al., 2003). Ainsi, les  $\beta$ -lactames et les glycopeptides sont impliqués dans l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne alors que les aminoglycosides, les tétracyclines et les macrolides se fixent au ribosome et inhibent la traduction (Petit et al., 1995). En revanche, les quinolones et les sulfonamides inhibent respectivement des enzymes essentielles à la réplication de l'ADN et à la synthèse de la voie métabolique des folates (Venkatachalam et al., 1994).

#### 1.1 Les $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamines constituent la famille d'antibiotiques la plus fréquemment utilisée pour leur large spectre antibactérien, leur activité bactéricide temps-dépendant, leur faible toxicité et le vaste choix de molécules disponibles (Ferech et al., 2006).

Elles partagent une structure commune qui comprend de façon constante un cycle  $\beta$ -lactame et, pour la plupart d'entre elles, un second cycle (Figure.1). Ainsi, en fonction des cycles et des chaînes latérales associées, on distingue (Chaabane et al., 2009) :

- les pénicillines, également appelées pénames : les molécules de ce groupe possèdent un cycle thiazolidine accolé au noyau  $\beta$ -lactame. Elles diffèrent par la nature de leur chaîne latérale (Nauciel, 2000) ;
- les céphalosporines : Constituées d'un noyau  $\beta$ -lactame associé à un noyau dihydrothiazine (Nauciel et Vildé, 2005) ;
- les carbapénèmes : se distinguent des pénicillines par la présence d'un atome de carbone au lieu d'un soufre en position 1 et d'une liaison insaturée en C2-C3, également présente sur les céphalosporines (Wolff et al., 2009) ;
- les monobactames : le noyau est limité au cycle  $\beta$ -lactame. Seul l'aztréonam est à l'heure actuelle utilisé en clinique humaine (Chaabane et al., 2009);

## Synthèse bibliographique

- les clavames : leur représentant est l'acide clavulanique.

À l'exception des clavames, toutes les  $\beta$ -lactamines possèdent une ou plusieurs chaînes latérales reliées au noyau  $\beta$ -lactame. Les chaînes latérales peuvent être similaires, voir identiques pour des membres de classes différentes, ce qui expliquerait l'existence de réactions croisées entre molécules de familles différentes (Carbon et al., 1995 ; Cavallo et al., 2004).

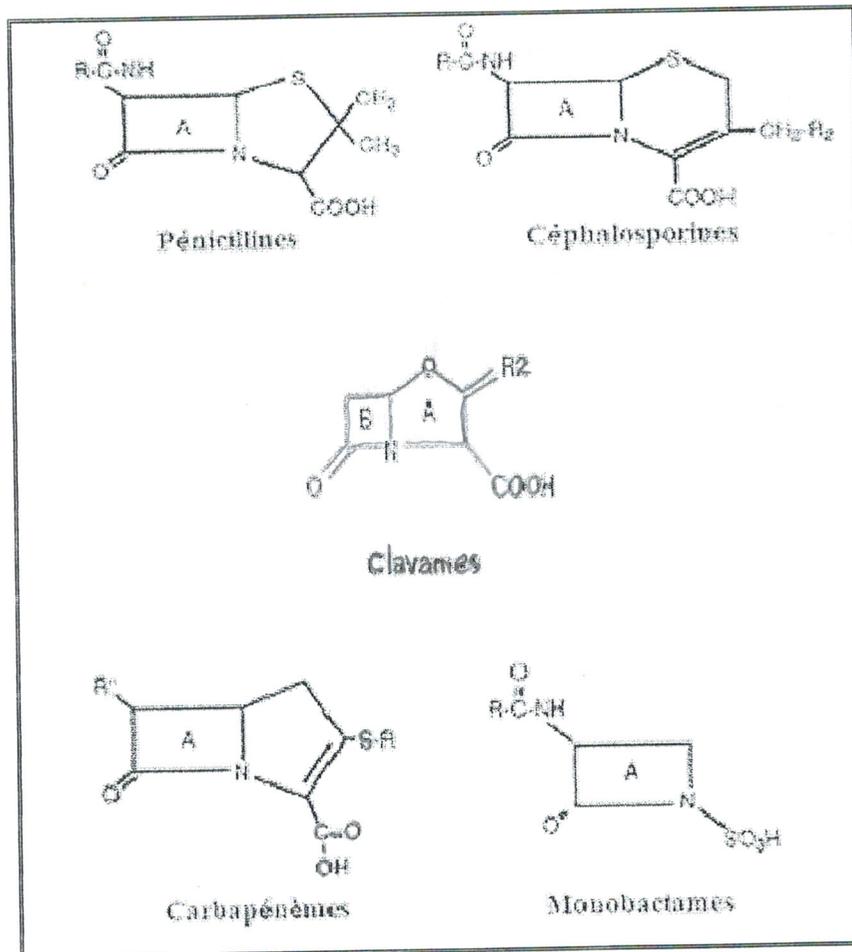


Figure 1. Structure chimique des  $\beta$ -lactamines (Chaabane et al., 2009).

Les  $\beta$ -lactamines ont un mécanisme d'action identique : elles inhibent la synthèse du péptidoglycane de la paroi en se fixant de façon covalente sur certaines enzymes responsables de la transpeptidation, étape essentielle de la synthèse du péptidoglycane, les empêchant ainsi d'assurer leurs fonctions (Cavallo et al., 2004).

Ces enzymes sont situées sur la face externe de la membrane interne et sont nommées protéines liant les pénicillines ou PLP (Fauchère et Avril. 2002). Les PLPs sont présentes en quantité variable (de 3 à plus de 8) selon les espèces bactériennes et présentent des affinités différentes pour chaque famille de  $\beta$ -lactamines (Fisher et al., 2005).

### 1.2 Les aminosides

Les aminosides sont une famille d'antibiotique connue depuis 1944, année de la découverte de la streptomycine. Ce sont des antibiotiques à usage quasi exclusivement hospitalier, et qui paraissent particulièrement utiles de par leur spectre et leur vitesse de bactéricidie dans le traitement des infections sévères ou à germes multirésistants (Bryskier. 1999). Ils sont caractérisés par la présence de sucres aminés interreliés par des liaisons glycosidiques à un aminocyclitol (Roy. 2000) (Figure.2). Les aminosides perturbent la synthèse des protéines au niveau de la fraction 30S du ribosome entraînant la destruction bactérienne (Yala et al., 2001).

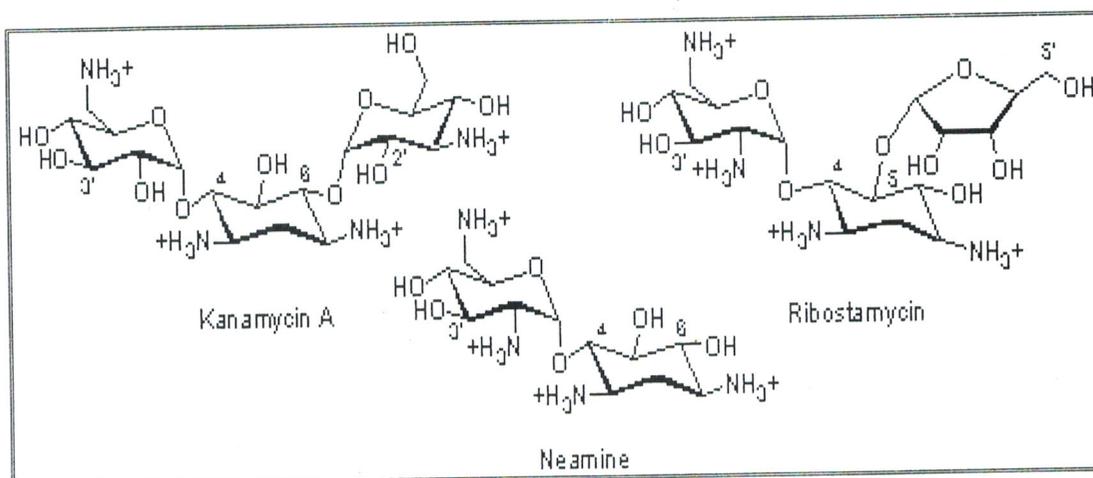


Figure 2. Structure de quelques antibiotiques aminosides  
(Gerard et Thompson. 1999)

Les aminosides sont des antibiotiques utilisés en association pour le traitement des infections bactériennes graves (Commandeur et al., 2010). L'efficacité dépend de taux thérapeutiques sanguins, il est donc possible de recommander des posologies (Veber et al., 1999) et de surveiller l'efficacité (Padoin et al., 2004) et la tolérance (Schortgen. 2005) de cette famille d'antibiotique.

### 1.3 Les quinolones

Les quinolones sont des agents antibactériens synthétiques dont l'activité antibactérienne est liée à l'inhibition de l'ADN gyrase bactérienne (Labro. 2006). La première quinolone, l'acide nalidixique, a été synthétisée en 1962 (Gill et al., 1999). En 1978 apparurent les fluoroquinolones ou quinolones de 2ème génération, qui sont des antibiotiques à large spectre, dérivés des quinolones (Femandes et Chu. 1987 ; Chu et Femandes. 1989 ; Moreau. 1990 ; Singlas. 1990). Elles résultent de modifications de la structure chimique des molécules initiales par l'adjonction d'un atome de fluor en position 6 et d'un cycle azoté en position 7 (Figure.3) (Ravat et al., 2000). Les fluoroquinolones inhibent aussi la topoisomérase IV, une autre enzyme qui démêle l'ADN pendant la réplication. Il n'est donc pas surprenant que les quinolones soient bactéricides (Prescott. 2003).

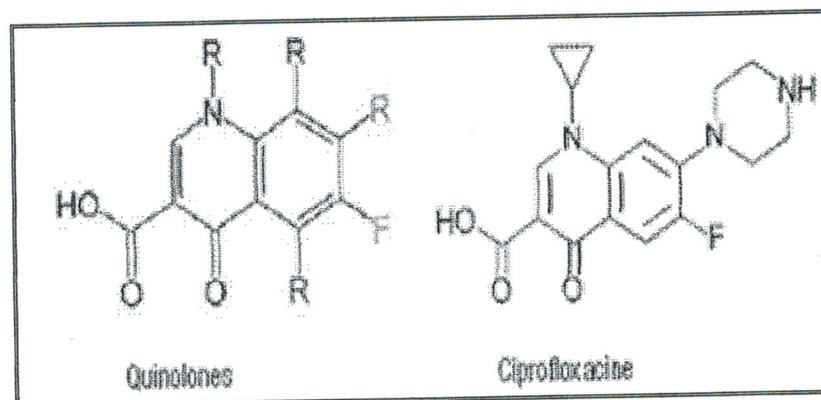


Figure 3. Structure de base des quinolones et de la ciprofloxacine (Faure. 2008).

Les fluoroquinolones sont largement prescrites dans les structures de soins. Cela s'explique par leur excellente biodisponibilité et leur large spectre autorisant l'utilisation de ces molécules dans des situations cliniques nombreuses et variables (Levent et al., 2010).

#### 1. Les bacilles à gram négatif non fermentaires

Les bacilles à Gram négatif non fermentaires (BGNnF) sont des bactéries aérobies strictes qui se développent habituellement sur milieu ordinaire et qui sont caractérisées

## Synthèse bibliographique

par un mode de production énergétique ne faisant pas intervenir la fermentation (Richard et Keredjian. 1995). Ce sont des bactéries ubiquitaires retrouvées dans l'environnement (sols, eaux...) et pouvant être responsables d'infections cliniques sur des terrains débilisés (Husson et al., 2000). Elles sont dites pathogènes opportunistes car, bien que pouvant être isolées d'infections communautaires, elles sont le plus souvent responsables d'infections nosocomiales (IN) (Jarvis et Martone. 1992). Les bacilles à Gram négatif non fermentaires sont à l'heure actuelle mieux classés grâce à de nombreuses études génétiques ADN-ADN ou ARN-ADN (Richard et Keredjian. 1995). Ils renferment un certain nombre de genres: *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Brevundimonas*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Chryseomonas*, *Flavimonas*, *Shewanella*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Flavobacterium*, *Weeksella*, *Alcaligenes*, *Sphingobacterium*, *Agrobacterium*, *Ochrobactrum* (Schuster. 2001). Au sein des *Pseudomonadaceae*; *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, et *Stenotrophomonas maltophilia*, sont les bactéries les plus fréquemment isolées lors d'infection nosocomiale (Berthelot et al., 2005).

En termes de fréquence, *P. aeruginosa* est le troisième germe responsable d'IN et *S. maltophilia*, arrive dans certaines études au deuxième rang des BGNnF (The French Prevalence Survey Study Group. 2000).

### 2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

L'espèce bactérienne *Pseudomonas aeruginosa* du latin *aeruginosus* appartient au genre *Pseudomonas* dans la famille des *Pseudomonadaceae*, appelée aussi bacille pyocyanique. La position phylogénétique de cette bactérie appartient aux eubactéries, à la classe des protéobactéries qui regroupe un grand nombre de bactéries à Gram-négatif aérobies ou anaérobies facultatives (Carpentier et al., 2003).

*P. aeruginosa* est un bacille à Gram négatif en forme de bâtonnet, de 0,5 à 0,8µm de diamètre sur 1 à 3µm de long, mobile grâce à un flagelle polaire généralement unique, dépourvu de spores et de capsules et possède une oxydase positive. C'est un germe hautement versatile doté d'une grande adaptabilité nutritionnelle et métabolique et n'exige aucun facteur de croissance (Hafiane et Ravaoarino. 2008). La température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37 °C strictement aérobie.

Aucune culture n'est obtenue à 4 °C ou à 46°C (Ojeniyi. 1994). Les cultures dégagent une odeur aromatique caractéristique (seringat), produisant le plus souvent des pigments de pyocyanine et de pyoverdine (Mahenthiralingham et al., 1996; Spikler et al., 2004). Les aspects des colonies sont 3 types : Les *Colonies la* (large), les *Colonies sm* (small) et les *Colonies M* (muqueuse) (Monteil et Harf Monteil. 2002). La pathogénicité de *P. aeruginosa* est attribuée à la production de plusieurs facteurs de virulence, hautement induits dans l'infection (Carpentier et al., 2003). Les nombreux facteurs de virulence de cette bactérie s'expriment préférentiellement sur les terrains immunodéprimés (Widmer et al., 1993; Talon et al., 1995). *P. aeruginosa* possède des fimbriae qui permettent l'adhésion aux muqueuses. Les souches qui colonisent les bronches des enfants atteints de mucoviscidose sont entourées d'une pseudo-capsule polysaccharidique qui augmente l'adhésion de la bactérie et exerce une action antiphagocytaire. La bactérie produit plusieurs toxines cytotoxiques : deux hémolysines et l'exotoxine A dont le mode d'action est similaire à celui de la toxine diphtérique (Nauciel et Vildé .2005). *P. aeruginosa* est un commensal peu fréquent chez l'homme, il est retrouvé chez 4 à 10 % des patients hospitalisés, les principaux sites de portage étant le tube digestif, les voies aériennes supérieures et la peau (Morrison et Wenzel. 1984 ; Blanc et al., 1998). La transmission croisée est le plus souvent manuportée par le personnel soignant soit directement de patient à patient soit indirectement à partir de surfaces inertes préalablement contaminées. Dans les services de soins intensifs, *P. aeruginosa* évolue par bouffées épidémiques sur un fond endémique (Talon et al., 1995; Bergmans et al., 1998).

### 2.2 *Acinetobacter baumannii*

La systématique des espèces actuellement placées dans le genre *Acinetobacter* est complexe car ces bactéries ubiquistes ont été isolées indépendamment par de nombreux auteurs et ont été placées dans divers genres (*Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Cytophaga*, *Diplococcus*, *Bacterium*, *Herella*, *Lingelsheimia*, *Mima*, *Micrococcus*, *Moxarella*, *Neisseria*...) (Fomba. 2005). Le genre *Acinetobacter* comprend actuellement 32 espèces dont 17 ont reçu un nom validé par les comités de nomenclature, d'autre n'ont pas reçu de nom du fait de la difficulté de l'identification

## Synthèse bibliographique

par les procédés traditionnels. Le genre *Acinetobacter* est désormais inclus dans la famille des *Moraxellaceae* elle-même incluse dans l'ordre des Pseudomonadales. Les infections humaines sont dues principalement à *Acinetobacter baumannii* (Denis et Ploy, 2007). Les *Acinetobacter* sont des coccobacilles, courts, souvent en diplocobacilles, immobiles, à gram négatif. Ce sont des aérobies strictes souvent en capsulées ne réduisant pas les nitrates et catalase positifs (Avril et al., 2000)<sup>a</sup>. La morphologie des *Acinetobacter* est identique à celle des *Moraxella*, mais la réaction d'oxydase, qui est négative chez les *Acinetobacter*, sépare les deux genres (Fauchère et Avril, 2002). *Acinetobacter baumannii* est la seule espèce capable de croître à 44 ou 45 °C. C'est un pathogène opportuniste, responsable d'infections nosocomiales sévères, causant de réelles difficultés thérapeutiques du fait de sa capacité à développer plusieurs mécanismes de résistances aux antibiotiques (Baron et al., 1995). *Acinetobacter baumannii* n'est pas connue pour produire des toxines diffusibles ou des cytolytines, quelques facteurs de virulence ont été identifiés. Des Études comparatives de génomique entre *A. baumannii* (multirésistante et sensible) et *Acinetobacter baylyi* de l'environnement ont identifié des gènes impliqués dans la biogenèse des pili, l'absorption du fer, le quorum sensing et un système de sécrétion de type IV faisant partie de la virulence de l'organisme (Vallenet et al., 2008). L'incidence des infections à *A. baumannii* a considérablement augmentée durant les 20 dernières années. En particulier dans les unités de soins intensifs et de chirurgie, services où le risque de colonisation et d'infection est important, vu le terrain particulier des patients et la fréquence des manœuvres invasives (Giamarellou et al., 2008).

### 2.3 *Stenotrophomonas maltophilia*

La première espèce de ce genre décrite en 1961 sous le nom de *Pseudomonas maltophilia* en raison de sa ciliature multitrèche polaire et de l'acidification du maltose fut classée en 1983 comme *Xanthomonas maltophilia*. Les différences avec les *Xanthomonas* se sont révélées plus importantes que les similitudes ; la création d'un nouveau genre *Stenotrophomonas* (qui se nourrit d'un faible nombre de substrats) fut proposée en 1993, comprenant *S. maltophilia* comme seule espèce (Denton et Kerr.

1998). *Stenotrophomonas maltophilia* est un bacille aérobie strict, assez fin, de longueur moyenne, polymorphe avec une ciliature polaire multitrèche (Niang. 2003). Il est ubiquitaire et saprophyte de l'environnement, mais également de l'homme colonisant surtout le nez, la gorge et le tube digestif (Kim et al., 2002; Gaillard et Lavigne. 2008). C'est l'un des pathogènes opportunistes multirésistants, responsable d'infections nosocomiales touchant en particulier les patients immunodéprimés (Denton et Kerr. 1998; Chang et al., 2004). Les isolats cliniques de *S. maltophilia* sont souvent très résistants à la plupart des agents antimicrobiens actuellement utilisés, y compris les carbapénèmes, et le traitement des infections à *S. maltophilia* représente un défi important pour les cliniciens comme pour les microbiologistes (Liaw et al., 2002).

### 2.4 *Burkholderia cepacia*

*Burkholderia cepacia* (auparavant nommé *P. cepacia*, *P. multivorans*, *P. kingii*) a été décrit pour la première fois en 1950 par Burkholder comme une bactérie phytopathogène (oignon, riz). Le nom d'espèce *multivorans* reflétait les potentialités métaboliques de cette espèce capable d'assimiler un grand nombre de substrats, dont les antibiotiques et les antiseptiques (Avril et al., 2000)<sup>b</sup>. C'est un bacille assez fin, de longueur moyenne, mobile grâce à une ciliature de type polaire multitrèche mais ses mouvements ressemblent souvent à ceux d'une bactérie à ciliature péritrice comme les entérobactéries (Henry et al., 2001). Contrairement aux informations détaillées sur les facteurs de virulence de *P. aeruginosa*, y compris la réglementation et la biosynthèse de l'alginate, les données sur les facteurs de virulence et la pathogénicité de *B. cepacia* sont insuffisants (Goldman et Klinger. 1986; Nelson et al., 1994).

*B. cepacia* semble produire quelques facteurs de virulence reconnus, et des modèles d'infection animales indiquent qu'il est moins virulent que *P. aeruginosa* (Stover et al., 1983). *Burkholderia cepacia* a été de plus en plus reconnu comme un pathogène nosocomial. Comme il est très résistant aux désinfectants tels que le gluconate de chlorhexidine et le chlorure de benzalkonium, il peut agir comme un agent pathogène opportuniste en particulier chez les patients immunodéprimés (Tana et al., 2010).

### 3. Mécanismes de résistance aux antibiotiques

Les BGNnF sont naturellement résistants à de nombreux antibiotiques et peuvent acquérir de nombreux mécanismes de résistance comme pour les  $\beta$ -lactamines, les aminosides et les fluoroquinolones (Berthelot et al., 2005). Ils sont capables de résister à de nombreux antibiotiques grâce à une membrane externe peu perméable et grâce au développement de nombreux mécanismes de résistances ( $\beta$ -lactamases, céphalosporinases, imperméabilité sélective ou non en relation avec les porines, modification des protéines liant la pénicilline, modification d'affinité de certaines enzymes...) pouvant s'associer (Philippon, 1998) et rendant selon les cas leur mise en évidence très difficile notamment dans le cas des systèmes d'efflux (Kohler et al., 1999). Ces bactéries peuvent être sélectionnées par une antibiothérapie à large spectre et devenir progressivement multirésistantes aux antibiotiques diffusant au sein des établissements de soins (Bertrand et al., 2000; Bonten et al., 2001).

L'utilisation croissante des antibiotiques à l'hôpital a contribué à l'émergence et à la diffusion de souches d'*A. baumannii* et de *Pseudomonas aeruginosa* résistantes à un grand nombre d'antibiotiques dont les  $\beta$ -lactamines à large spectre, les aminosides et les fluoroquinolones (Nordmann, 2003 ; Nemeč et al., 2004)<sup>a</sup>.

#### 3.1 Résistance aux $\beta$ -lactamines

##### 3.1.1 Résistance non enzymatique

###### 3.1.1.1 Imperméabilité membranaire:

La résistance enzymatique peut être renforcée par les modifications de la perméabilité membranaire due à la perte d'OMPs qui agissent comme des porines pour le transport de substances à travers la membrane externe. *Pseudomonas aeruginosa* est résistante à de nombreuses  $\beta$ -lactamines hydrophobes (imperméabilité). Les porines jouent un rôle important dans la pénétration transmembranaire des  $\beta$ -lactamines. Une modification qualitative ou une diminution de la production de la porine OprD2 entraîne une résistance sélective à l'imipénème (Poole, 2004) et au méropénème dans une moindre mesure (Poirel, 2006).

## Synthèse bibliographique

*Acinetobacter baumannii* a relativement peu de porines comparé à d'autres bactéries à Gram-négatif, ce qui peut expliquer en partie certaines de ses résistances aux agents antimicrobiens (Sato et Nakae, 1991). La perte de porine a été le plus souvent en cause dans la résistance aux  $\beta$ -lactamines chez *Acinetobacter baumannii*, avec l'absence d'une protéine de 33-36 kDa (Tomás et al., 2005), une protéine de 29 kDa nommée CarO (Siroy et al., 2006) et une protéine de 43 kDa homologue à la OprD de *Pseudomonas aeruginosa* (Dupont et al., 2005) impliqués dans la résistance à l'imipénème. La résistance ne s'exprime à haut niveau que si la perte de D2 est accompagnée d'une hyperproduction de la céphalosporinase chromosomique chez *Pseudomonas aeruginosa* (Sougakoff et Trystram, 2003) et la surexpression du système d'efflux MexEF-OprN est associée à une diminution de la sensibilité à l'imipénème par diminution de l'expression de la porine OprD2 (Poole, 2004). La protéine OmpA considérée comme un facteur de virulence, est homologue aux porines OmpA et OmpF présentes chez les entérobactéries et *P. aeruginosa*, où elles servent de canaux pour ralentir les  $\beta$ -lactamines. Cependant, les études sur la multirésistance des *A. baumannii* n'ont pas encore identifié le rôle exacte de l'OmpA dans la résistance aux  $\beta$ -lactamines (Bratu et al., 2008). L'expression réduite des PLP2, peut expliquer la résistance d'*A. baumannii* aux carbapénèmes (Bou et al., 2000).

### 3.1.1.2 Systèmes d'efflux :

Les bactéries à Gram négatif sont caractérisées par la présence d'une membrane externe dont le rôle principal est de s'opposer à la pénétration de grosses molécules ou de molécules hydrophobes nocives. Cette membrane constitue un obstacle pour les systèmes d'efflux de ces bactéries. Elles ont donc élaboré des systèmes complexes à trois composants qui permettent le rejet des molécules depuis l'espace périplasmique vers le milieu extérieur (Piddock, 2006). Ces systèmes de pompes nécessitent la juxtaposition d'un transporteur (une protéine associée à la membrane cytoplasmique) et d'un canal localisé dans la membrane externe afin de permettre l'excrétion d'une molécule indésirable du cytoplasme vers le milieu extracellulaire en transitant par le périplasme (Nikaido, 1996).

## Synthèse bibliographique

---

De nombreuses pompes d'efflux ont été décrites chez *P.aeruginosa* qui sont désignées d'après leurs composants respectifs avec dans l'ordre : la protéine de fusion membranaire, la pompe, la protéine de membrane externe (MexAB-OprM ; MexCD-OprJ ; MexEF-OprN et MexXY-OprM) (Pool. 2004). Ces systèmes d'efflux ne sont pas exprimés de la même façon ; seul MexAB-OprM est produit constitutivement, les trois autres étant réprimés dans les souches sauvages (Masuda et al., 2000 ; Hocquet. 2003). La surexpression stable des systèmes d'efflux entraîne une résistance à tout un ensemble d'antibiotiques qui ne sont pas structurellement reliés (Tableau. 1). Ainsi, la surproduction de MexAB-OprM entraîne une diminution de sensibilité à certaines  $\beta$ -lactamines, aux fluoroquinolones, à la tétracycline, la novobiocine, au triméthoprim et au chloramphénicol. Celle de MexCD-OprJ aux  $\beta$ -lactamines zwitterioniques (céfépime, cefpirome), aux fluoroquinolones, au triméthoprim (Poirel. 2006), le système MexEF-OprN aux fluoroquinolones, triméthoprim, chloramphénicol et aux tétracyclines et le système MexXY-OprM à certaines  $\beta$ -lactamines (céfépime, cefpirome), aux aminosides, à la tetracycline et à l'érythromycine (Masuda et al., 2000 ; Livermore. 2002; Hoquet et al., 2004).

Chez *Acinetobacter baumannii*, deux systèmes d'efflux ont été caractérisés, AdeABC et AdeIJK. La résistance aux aminoglycosides,  $\beta$ -Lactamines, chloramphénicol, l'érythromycine et aux tétracyclines est due à la surexpression de l'AdeABC, dont l'expression est régulée par le système a deux composantes AdeRS (Marchand et al., 2004). Une pompe appartenant à la famille MATE (multidrug and toxic compound extrusion), AbeM, a également été caractérisé. Sa surexpression conduit a la réduction de la sensibilité d'*Acinetobacter baumannii* aux quinolones, la gentamicine, la kanamycine, l'érythromycine, le chloramphénicol et triméthoprim (Su et al., 2005). Le système d'efflux le plus récent à être décrit, désigné AbeS. Il a été démontré qu'il contribue à la résistance aux quinolones, macrolides et au chloramphénicol (Srinivasan et al., 2009).

*S. maltophilia* peut rapidement développer une résistance aux fluoroquinolones par des mutations dans les protéines de membrane externe et la surproduction de pompes à efflux (Zhang et al., 2000 ; Mendoza et al., 2007).

**Tableau 1. Phénotypes de résistance non enzymatique de *P. aeruginosa***  
(Nordmann, 2006)

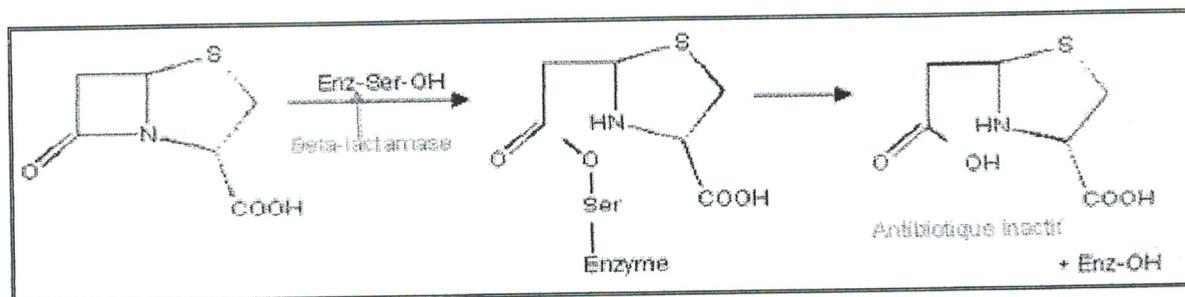
$\beta$ -lactamines	Perte de porine OprD2	Surexpression MexAB-OprM	Surexpression MexCD-OprJ	Surexpression MexEF-OprN	Surexpression MexXY-OprM
Ticarcline	S	I/R	S	S	S
Piperacilline	S	S	S	S	S
Ceftazidime	S	S	S	S	S
Céfépime	S	S	I/R	S	I/R
Aztréonam	S	I/R	S	S	S
Imipénème	R	S	S	I	S
Méropénème	I/R	S/I	S	I	S

I, intermédiaire ; R, résistant ; S, sensible.

### 3.1.2 Résistance enzymatique par production de $\beta$ -lactamases

#### 3.1.2.1 Généralités

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes bactériennes qui catalysent de manière efficace et irréversible l'hydrolyse de la liaison amide du cycle  $\beta$ -lactame des antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines donnant un produit biologiquement inactif (**Figure.4**) qui perd totalement son activité antimicrobienne (**Matagne et al., 1998 ; Page, 1999**). La production des  $\beta$ -lactamases est le mécanisme de résistance le plus répandu et le plus important des bactéries vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines (**Livermore, 1995**)<sup>a</sup>. La dissémination des  $\beta$ -lactamases communes et l'apparition de nouveaux enzymes ou d'enzymes mutants sont reliées directement à l'utilisation abusive des  $\beta$ -lactamines dans le domaine de la santé humaine et animale et en agriculture (**Kunin et al., 1990 ; Witte, 1997 ; Normark et Normark, 2002**).



**Figure 4. Schéma réactionnel de l'ouverture du cycle  $\beta$ -lactame  
(Barrial et Scotet, 2006).**

Généralement, les  $\beta$ -lactamases sont classées suivant deux schémas: la classification moléculaire d'Amblar (Amblar, 1980) et la classification fonctionnelle de Bush-Jacoby-Medeiros (Bush et al., 1995). La classification moléculaire tient compte de la structure primaire des différentes  $\beta$ -lactamases et les divisent en quatre classes (A à D). Pour la classification fonctionnelle, les auteurs tiennent compte de la fonctionnalité des  $\beta$ -lactamases (substrat, profil d'inhibition) et divisent aussi ces enzymes en quatre groupes (1 à 4) avec plusieurs sous-groupes. Quoique différents de par le principe, il existe une correspondance entre les deux schémas (Bush et al., 1995) (Tableau. 2). Celles appartenant aux classes A, C et D sont des enzymes à sérine active, seule la classe B regroupant les métallo- $\beta$ -lactamases (MBL) nécessitant les ions  $Zn^{++}$  pour leur activité (Phillipon et Arlet. 2006). Les  $\beta$ -lactamases appartenant à la classe A, en plus de constituer la plus grande classe de  $\beta$ -lactamases à sérine, sont aussi les mieux caractérisées au point de vue de leur mécanisme catalytique (De Wals. 2007). Les enzymes de la classe B ou métallo-enzymes (Galleni et al., 2001), sont inhibées par les chélateurs d'ions comme l'EDTA et non par les inhibiteurs classiques de  $\beta$ -lactamases (Bush et al., 1995). Ce sont des enzymes produites essentiellement par certaines bactéries de l'environnement comme *Chryseobacterium* spp., *Stenotrophomonas maltophilia* ou d'autres bacilles à Gram négatif. La particularité de certaines de ces enzymes est de conférer la résistance aux carbapénèmes dont l'imipénème (Arlet et Phillipon. 2003).

## Synthèse bibliographique

---

Dans la classe C, on retrouve les céphalosporinases qui sont des enzymes résistantes à l'action de l'acide clavulanique et le sulbactam; toutefois certaines sont faiblement inhibées par le tazobactam (Doi et al., 2004). Leur hyperproduction est associée au phénotype de multirésistance observé chez certains bacilles à Gram négatif. Au départ à médiation chromosomique, les  $\beta$ -lactamases de la classe C sont aussi aujourd'hui à médiation plasmidique (Philippon et al., 2002). Les bêta-lactamases de classe D (OXA) ont été identifiées généralement chez *Pseudomonas aeruginosa*. Elles ont été associées à la résistance aux carbapénèmes, mais seulement chez *Acinetobacter* spp., probablement du fait que les organismes ont une faible perméabilité aux carbapénèmes, permettant aux enzymes ayant une faible activité de produire une résistance cliniquement significative (Livermore et Woodford. 2000). Les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE) sont spécifiquement définis comme des  $\beta$ -lactamases capables d'hydrolyser les céphalosporines de troisième génération et sont inhibées par l'inhibiteur des  $\beta$ -lactamases, l'acide clavulanique (Bush et al., 1995). La plupart des BLSE appartiennent aux familles TEM (TEM3-133), SHV (SHV-2-54), CTX-M (CTX-M1-28) (Bonnet. 2004) ou OXA (Livermore. 1995<sup>b</sup>; Livermore et Woodford. 2000).

## Synthèse bibliographique

**Tableau 2. Correspondance entre la classification d'Ambler et la classification de Bush (Bush et al., 1995).**

Groupes selon Bush-Jacoby-Medeiros	Classes d'Ambler	Enzymes (exemples)	Substrats préférentiels	Inhibées par		Organismes	Localisation
				Ac. clavulanique	EDTA		
1	C	AmpC	Céphalosporines	-	-	Bacilles GRAM négatif	Chromosomique Plasmidique
2a	A	PC1	Pénicillines	+	-	Bactéries GRAM positif	Plasmidique
2b	A	TEM-1, 2 SHV-1	Pénicillines céphalosporines	+	-	Bacilles GRAM négatif Cocci GRAM négatif	Plasmidique Chromosomique
2be	A	TEM-dérivés SHV-dérivés CTX-M-1-26	Pénicillines, céphalosporines à large spectre et à spectre étendu	+	-	Bacilles GRAM négatif	Plasmidique
	D	PER GES-1 OXY-1/2 (K1)  OXA- 11,14,16,17		±	-	<i>P.aeruginosa</i> <i>P.aeruginosa</i> <i>K.oxytoca</i>  <i>Acinetobacter spp</i> <i>P.aeruginosa</i>	Chromosomique Plasmidique
2br	A	TEM-30-36, TRC-1, SHV-49	Pénicillines	±	-	<i>E.coli</i> , <i>K.pneumoniae</i> (résistant aux inhibiteurs)	Plasmidique
2c	A	PSE-1,3 4  BRO-1-3	Pénicillines, carbénicilline	+	-	<i>P.aeruginosa</i> <i>A.baumannii</i>  <i>M.catarrhalis</i>	Variable
2d	D	OXA-1-10 PSE-2	Pénicillines cloxacilline	±	-	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>P.aeruginosa</i>	Variable
2e	A	CepA FPM-1  L2	Céphalosporines	+	-	<i>Bacteroides sp</i> <i>Proteus sp</i>  <i>S.maltophilia</i> (inducible)	Variable
2f	A	NMC-A Sme-1-3 Imi-1-3  KPC-1,2  GES-2	Pénicillines céphalosporines carbapénèmes	+	-	<i>E.cloacae</i> <i>S.marcescens</i>	Chromosomique
	D	OXA-24-26,40, 51,58,72		±	-	<i>K.pneumoniae</i>  <i>P.aeruginosa</i>  <i>A.baumannii</i>	Plasmidique Plasmidique Chromosomique
3	B	VIM, IMP, SPM, GIM   L1 CcrA	Pénicillines céphalosporines carbapénèmes	-	-	<i>P.aeruginosa</i> <i>A.species</i> <i>Enterobacteriaceae</i>  <i>S.maltophilia</i> <i>Bacteroides sp</i>	Variable

### 3.1.2.2 Céphalosporinase naturelle et hyperproduite :

*Pseudomonas aeruginosa* possède deux  $\beta$ -lactamases naturelles (**Bagge et al., 2002 ; Livermore. 2002 ; Girlish et al., 2004**). Une oxacillinase, OXA-50, de spectre étroit a été décrite très récemment (**Girlish et al., 2004**) dont la contribution au phénotype de résistance naturelle n'est pas significative. En revanche, la céphalosporinase naturelle (AmpC) contribue au phénotype de résistance naturelle. L'expression du gène AmpC est inductible et l'enzyme inactive la plupart des pénicillines céphalosporines inductrices (**Courvalin et al., 2006**) (l'amoxiciline, l'acide clavulanique et aux céphalosporines de première et deuxième génération (C1G, C2G) — céfalotine et céfoxitine notamment).

*Acinetobacter baumannii* possède naturellement une céphalosporinase chromosomique AmpC non-inductible et une oxacillinase de classe D intrinsèque. Les oxacillinases d'*Acinetobacter baumannii* appartiennent au groupe d'enzymes OXA-51 qui constitue plus de 40 séquences variantes (**Koh et al., 2007 ; Alsultan et al., 2009**). La nature omniprésente du gène OXA-51 chez *A. baumannii* a conduit à ce que ce gène devienne un marqueur génétique important dans l'identification de la souche au niveau de l'espèce (**Turton et al., 2006**). Les enzymes OXA-51 sont capables d'hydrolyser les pénicillines (pénicilline, l'ampicilline, ticarcilline et pipéracilline) et carbapénèmes (imipénème et méropénème) mais que très faiblement. Ils ne sont pas actifs contre les céphalosporines à spectre élargi (**Héritier et al., 2005**).

La résistance de *P. aeruginosa* par hyperproduction de céphalosporinases est connue de longue date. Elle résulte d'une dérégulation permanente et stable du gène de la céphalosporinase, liée à une mutation d'un gène de régulation. Elle induit une résistance à toutes les  $\beta$ -lactamines, à l'exception des carbapénèmes (**Nordmann. 2003**). Les céphalosporines de 4<sup>e</sup> génération (céfépime, cefpirome) bien que théoriquement plus stables vis-à-vis de l'hydrolyse par des céphalosporinases sont en fait rarement efficaces sur des souches surexprimant AmpC car l'association d'un certain niveau de résistance naturelle au céfépime/cefpirome associé à une hyperexpression de AmpC compromet alors totalement l'efficacité de ces molécules. (**Livermore. 2002; Rossolini et Mantengoli. 2005 ; Poirel. 2006**).

### 3.1.2.3 Pénicillinase transférable de spectre restreint

Chez *Pseudomonas aeruginosa*, elle est liée à la production de  $\beta$ -lactamase de type PSE, TEM ou OXA (Jehl et al., 1995) codées par des gènes habituellement plasmidiques. Par rapport aux souches sauvages, ces pénicillinases (ou oxacillinases) entraînent une résistance supplémentaire aux uréidopénicillines (pipéracilline, ticarcilline) et à la cefsulodine. Une sensibilité à l'association d'une uréidopénicilline et d'un inhibiteur (sulbactam ou acide clavulanique) est parfois, mais non constamment, préservée, car les inhibiteurs sont faiblement actifs sur ces pénicillinases, notamment la carbénicillinase de type 1 (PSE-1). La ceftazidime et l'imipénème restent actifs, mais le céfépime, le ceftiofime ou l'aztréonam ne le sont qu'inconstamment (Nordmann, 2003). Les pénicillinases à large spectre sont différenciées de celle à spectre restreint par une résistance plus élevée aux antibiotiques cités (Vedel, 2005).

### 3.1.2.4 Les carbapénémases

Les carbapénémases sont des enzymes produites essentiellement par les bacilles à Gram négatif pouvant appartenir à la classe A d'Ambler (sérines enzymes) comme à la classe B d'Ambler (métallo-enzymes), ces dernières (les métallo-enzymes) confèrent la résistance à la plupart des  $\beta$ -lactamines existantes en plus de la résistance aux carbapénèmes (Walsh et al., 2005). En outre, ces enzymes possèdent dans leur site actif un cation indispensable à leur activité qui est invariablement le zinc. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, des études rapportent l'existence de souches productrices de métallo- $\beta$ -lactamases (MBL) au sein de cette espèce (Ait el kadi et al., 2006 ; Livemore et Woodford, 2006). Ce sont des métalloprotéines, chromosomiques ou plasmidiques. Ces enzymes ont une activité catalytique beaucoup plus forte que les autres et hydrolysent toutes les  $\beta$ -lactamines sauf l'aztréonam. Ces carbapénémases acquises constituent actuellement 4 groupes : IMP, VIM (Verona IMipenemase), SPM (Sao Paulo Metallo- $\beta$ -lactamase) et GIM (German IMipenemase) (Walsh et al., 2005).

L'activité de ces enzymes est inhibée par addition de chélateur d'ions bivalents (EDTA) (Poirel, 2006). Les métallo-carbapénémases de classe B de type VIM, IMP et SIM ont été retrouvés chez *A. baumannii*, en particulier dans la région Asie-Pacifique et en Amérique latine (Yum et al., 2002; Fritsche et al., 2005; Walsh, 2005; Perez et al., 2007). Des  $\beta$ -Lactamases de classe D OXA (oxacilinasés) qui inactivent les carbapénèmes ont également été signalées chez *Acinetobacter baumannii* (Brown et Amyes, 2006; Pournaras et al., 2006). La première  $\beta$ -lactamase de classe D découverte chez une souche d'*Acinetobacter baumannii* est l'OXA-23 ; depuis, d'autres oxacillinasés à activité carbapénémase ont été caractérisées (Poirel et al., 2005<sup>b</sup> ; Brown et Amyes, 2006) (Tableau. 3).

### 3.1.2.5 Béta-lactamase à spectre élargi

Contrairement à ce que l'on avait pu croire, les BLSE ne sont pas l'apanage des entérobactéries. Il en existe plusieurs, produites par différents gènes ou familles de gènes : non seulement *TEM* et *SHV*, comme chez les entérobactéries, mais aussi *PER-1*, *VEB-1*, *GES-1/2*... Elles ont le même spectre de substrats mais ne sont pas liées génétiquement. Ce sont des enzymes redoutables, puisqu'elles induisent une résistance à toutes les  $\beta$ -lactamines, à l'exception de l'imipénème (De Champs et al., 2002). Cette exception même est menacée par certaines BLSE, de type *GES-2*, dont le spectre s'étend à l'imipénème (Poirel et al., 2000 ; Prats et al., 2002). Des  $\beta$ -lactamases à spectre étendue (BLSE) de type *PER-1* et *VEB-1* ont été décrites chez *Acinetobacter baumannii* (Carbonne et al., 2005; Poirel et Nordmann, 2006). Toutefois, il convient de souligner que la détection de la contribution exacte de BLSE est compliquée par la présence simultanée d'enzymes AmpC (Perez et al., 2007).

Les  $\beta$ -lactamases qui confèrent une résistance à toutes les  $\beta$ -lactames antipseudomonale sauf les carbapénèmes sont maintenant répandues (Aubron et al., 2005 ; Masterton et Turner, 2006). Les gènes codant pour ces enzymes résultent de mutations ponctuelles dans les gènes de type OXA, et moins fréquemment dans les gènes de type TEM (*TEM-1* ou *TEM-2*) ou SHV (*SHV-1*) (Naas et Nordmann, 1999).

## Synthèse bibliographique

Depuis la description de PER-1 en 1991, différentes BLSE ont été rapportées chez *P. aeruginosa*: dérivées de TEM et SHV (TEM-4, TEM-21, TEM-42, SHV-2a, SHV-5, SHV-12) mais aussi de type VEB, GES ou BEL (Weldhagen et al., 2003).

L'OXA-18 est la seule oxacillinease de *Pseudomonas aeruginosa* dont l'activité est bien inhibée par l'acide clavulanique et dont le phénotype de résistance induit est en tous points similaire à celui d'une  $\beta$ -lactamase à spectre étendu de classe A (Naas et Nordmann, 1999). La plupart des oxacillineases à spectre étendu chez *P. aeruginosa* sont dérivées par substitutions ponctuelles des  $\beta$ -lactamases OXA-10 (OXA-11, OXA-14, OXA-16, OXA-17, OXA-19, OXA-28) et OXA-2 (OXA-15, OXA-32) (Naas et Nordmann, 1999 ; Poirel et al., 2005<sup>a</sup>). Ces variants hydrolysent les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération et/ou l'aztréonam à des degrés variables et leur activité n'est pas inhibée par l'acide clavulanique (Naas et Nordmann, 1999). L'hydrolyse du céfépime/cefpirome est souvent marquée (Tableau. 4). Le support génétique de ces enzymes est plasmidique ou chromosomique. Si les oxacillineases de spectre étroit de *Pseudomonas aeruginosa* (OXA-1, OXA-2, etc) peuvent être détectées chez les entérobactéries, les oxacillineases à large spectre n'ont été identifiées pour l'instant que chez *P. aeruginosa* (Courvalin et al., 2006).

**Tableau 3. Phénotypes de résistances d'*Acinetobacter baumannii* aux  $\beta$ -lactamines (Jolly-Guillou. 2006)**

Phénotypes et mécanisme de résistances	Modification de sensibilité	Effet des inhibiteurs	
		Activité inhibitrice	Activité intrinsèque
<b>Phénotype 1</b> Céphalosporinase bas niveau	Aminopénicilline C1G+C2G <sup>a</sup>	Tazobactam et Sulbactam	Sulbactam Actif
<b>Phénotype 2</b> Pénicillinase plasmidique (TEM-1,-2,CARB-5, OXA 21) <sup>b</sup> + Céphalosporinase bas niveau	Aminopénicilline Ticarcilline Piperacilline Sulbactam C1G+C2G	Clavulanate, Tazobactam et Sulbactam ++ (TEM-CARB) +/- (OXA)	++
<b>Phénotype 3</b> Céphalosporinase chromosomique haut niveau (ACE 1-4) <sup>b</sup>	C1G+C2G+C3G Aminopénicilline Ureidopénicilline Ticarcilline (partiel)	Tazobactam Sulbactam et cloxacilline	Sulbactam Actif
<b>Phénotype 4</b> Céphalosporinase chromosomique haut niveau + Pénicillinase plasmidique <sup>b</sup>	Aminopénicilline Ticarcilline Piperacilline Sulbactam C1G+C2G+C3G	(+) Clavulanate, Tazobactam et	++
<b>Phénotype 5</b> OXA 23-27, 37, 40, 51, 58 IMP-2 IMP-4, IMP-5, VIM-2	Imipénème (autres $\beta$ -lactamines= Activité variables)	EDTA+ sur IMP/VIM Clavulanate +/- sur OXA	
<b>Phénotype 6</b> $\beta$ -Lactamases à spectre étendu (PER-1, VEB-1)	Toutes les $\beta$ -lactamines sauf l'imipénème	Clavulanate, Tazobactam Sulbactam	++

<sup>a</sup>CXG, céphalosporine de X<sup>e</sup> génération.

<sup>b</sup>Fréquence : 40% des souches.

## Synthèse bibliographique

**Tableau 4. Phénotypes de résistance enzymatique de *P. aeruginosa* aux  $\beta$ -lactamines (Nordmann. 2006).**

$\beta$ -lactamines	Céphalo- sporine Hyperproduite	Pénicillinase TEM/PSE (CARB)	Oxacillinase de spectre étroit	$\beta$ - lactamases à spectre étendu classe A	$\beta$ - lactamases à spectre étendu OXA	Carba- pénémase (IMP, VIM SPM, GIM)
Tiarcilline	R <sup>a</sup>	R	R	R	R	R
Tiarcilline+ Ac.clavulanique	R	I/S	I/R	S/I <sup>b</sup>	I/R	R
Piperacilline	I/R	I/R	I/R	I/R	I/R	I/S <sup>b</sup>
Piperacilline+ Tazobactam	I/R	I/S	I/R	S <sup>b</sup> /I	I/R	I/S <sup>b</sup>
Cefsulodine	I/R	I/R	I/R	R	I/R	R
Ceftazidime	I/R	S	S	R	I/R <sup>b</sup>	R
Cefpirome	I/R	S	I/R <sup>c</sup>	I/R	I/R	R
Céfépime	I/R	S	I/R	I/R	I/R	I/R
Aztréonam	I/R	S	S	R	S/I	S
Imipénème	S	S	S	S	S	R
Méropénème	S	S	S	S	S	R

<sup>a</sup>I, intermédiaire ; R, résistant ; S, sensible.

<sup>b</sup>Phénotype observé in vitro et non réinterprété.

<sup>c</sup>Certaines oxacillinases de spectre étroit entraînent une résistance aux céphalosporines de 4<sup>ème</sup> génération.

### 3.2 Résistance aux aminosides

La résistance d'*A. baumannii* aux aminosides a connu depuis 1980, une évolution très brutale (Ben Haj Khalifa et Khedher. 2009). En plus de la pompe d'efflux AdeABC, la résistance est médiée par les aminosides phosphotransférases, les acétyltransférases et adényltransférases (Nemec et al., 2004<sup>b</sup>; Van Looveren et Goosens. 2004). Une autre série d'enzymes, les méthyltransférases de l'ARNr 16S, qui confèrent une résistance de haut niveau à tous les aminosides formulés, ont été récemment décrits (Nicola et al., 2010). La résistance aux aminosides de *P.aeruginosa* est souvent associée à la surexpression de pompes à efflux ou la production d'enzymes d'inactivation à médiation chromosomique ou plasmidique, qui aboutissent à des modifications chimiques des aminosides (Hancock et Speert. 2000; Giamarellou et Antoniadou, 2001; Poole. 2005).

### 3.3 Résistance aux fluoroquinolones

Les bacilles à Gram négatif qui sont résistants aux fluoroquinolones, sont souvent résistants aux autres classes d'antibiotiques, qui peuvent être liées à la participation des pompes à efflux surexprimées dans la résistance aux fluoroquinolones chez ces bactéries (Kriengkauykiat et al., 2005). En plus du système d'efflux, les mutations à la fois au niveau de la *gyrA* et *parC* sont responsables de la résistance aux quinolones (Vila et al., 1995; Vila et al., 1997). La surexpression de pompes à efflux semble jouer un rôle important dans la résistance aux fluoroquinolones chez *Pseudomonas aeruginosa*, mais ne semble généralement pas suffisante en soi pour conférer une résistance importante. Pour les fluoroquinolones, la surexpression de pompes à efflux est généralement associée à des mutations de l'ADN gyrase, pour conférer une résistance à haut niveau chez *P.aeruginosa* (Le Thomas et al., 2001; Higgins et al., 2003). Une modification par méthylation du RNA 16S ribosomal a été récemment décrite (Yokoyama et al., 2003).

Les nouvelles fluoroquinolones telle que la clinafloxacin, gatifloxacin, lévofloxacin et gémifloxacin seraient plus active sur *A. baumannii* que la ciprofloxacin. La fréquence de survenue de mutation de la *gyrA* semble être plus

## *Synthèse bibliographique*

---

faible avec ces nouvelles fluoroquinolones (**Heinemann et al., 2000**). Cependant, les résistances aux fluoroquinolones ne cessent d'augmenter, et leur utilisation a été identifiée comme facteur de risque de colonisation et d'infection à bactéries multirésistantes (**Nseir et al., 2005**).

# *Matériels et Méthodes*

## 1. Matériel

### 1.1 Matériel biologique

#### 1.1.1 Souches étudiées

100 souches de bacilles a gram négatif non fermentants (54 *Acinetobacter baumannii* et 46 *Pseudomonas aeruginosa*) isolées entre le mois d'octobre 2009 et mai 2010 au niveau de différents services du C.H.U de Sidi Bel Abbes on fait l'objet de cette étude.

#### 1.1.2 Souches de références et plasmides utilisés

- ATCC 27853 (*Pseudomonas aeruginosa*).
- ATCC 25922 (*E. coli*).
- VP517 (*E. coli*).

### 1.2 Milieux de culture

#### 1.2.1 Milieux de culture liquide

- Bouillon nutritif (BN)
- Bouillon Cœur cerveau (BHIB)
- Bouillon Luria (LB)
- Mueller Hinton liquide (MHL)

#### 1.2.2 Milieux de culture solide

- Gélose nutritive
- Mac Conkey
- Mueller Hinton
- Milieu triple sucres (TSI)

### 1.3 Tests biochimiques

- Galerie API 20NE

### **1.4 Solutions et Tampons (Annexes.6 et 7)**

- Solution de l'EDTA 0.5M pH 8
- Tampon TE
- Solution de lyse
- Phénol-Chloroform-Isoamylalcool (24 :25 :1) (Sigma)
- Tampon TBE 1X
- Tampon de charge
- Solution de BET (Sigma)

### **1.5 Antibiotiques**

#### **1.5.1 En disques (Bio Rad)**

Ticarcilline (75 µg), Ticarcilline + Acide Clavulanique (75/10 µg), Pipéracilline (75 µg), Pipéracilline + Tazobactam (75/10 µg), Imipénème (10 µg), Aztréonam (30 µg), Céfotaxime (30 µg), Céftazidime (30 µg), Céfopérazone (30 µg), Cefsulodine (30 µg), Cefpirome (30µg), Céftriaxone (30µg), Céfépime (30 µg), Tobramycine (10 µg), Amikacine (30 µg), Gentamicine (15 µg), Kanamycine (30 UI), Ciprofloxacine (5 µg), Ofloxacine (5µg), Colistine (50µg).

#### **1.5.2 En poudre**

Ticarcilline (Glaxo Smith Kline), Ticarcilline + Acide Clavulanique (Glaxo Smith Kline), Pipéracilline (Dacota<sup>R</sup> Pharm), Pipéracilline + Tazobactam (Wyeth Pharmaceuticals), Cloxacilline (Astellas), Imipénème (MSD), Aztréonam (Sanofi-Synthelabo), Céfotaxime (Aventis), Céftazidime (Glaxo Smith Kline), Céfépime (Bristol-Myers Squibb), Tobramycine (Merck), Amikacine (Bristol-Myers Squibb), Gentamicine (Panpharma), Ciprofloxacine (Bayer Pharma).

### **2. Méthodes :**

#### **2.1 Prélèvements :**

Les prélèvements ont été réalisés par écouvillonnage sur des plaies post-opératoires infectées et au niveau de l'environnement, ainsi que par récupération des sondes d'intubation et des sondes urinaires des patients hospitalisés au niveau de différents services du C.H.U de Sidi Bel Abbes, puis acheminés au laboratoire dans des tubes de bouillon nutritif pour être incubés 18 à 24 heures à 37°C.

#### **2.2 Isolement et purification**

La gélose Mac-Conkey est utilisée pour l'isolement de bactéries à Gram négatif grâce à l'action de deux inhibiteurs, cristal violet pour l'inhibition de la flore Gram+ et les sels biliaires pour la sélection des entérobactéries. Le milieuensemencé est incubé à 37°C pendant 24 à 48 heures. On procède à la purification des colonies bactériennes par réisolement sur le même milieu gélosés pour obtenir des souches pures à identifier. L'isolement des souches *Pseudomonas .spp* est réalisé sur gélose nutritive supplémentée de 0.02% de cétrimide (Sigma) et sont incubées 48 heures à 37 °C (Crespo et al., 2004). Les colonies présentant une pigmentation verte ou rose sont repiquées sur le même milieu et incubées pendant 48 heures à 37°C, puis sur gélose Mac Conkey 24 heures à 42°C.

#### **2.3 Identification**

On procède à l'identification des germes bactériens ciblés par :

- ‡ Le test TSI (milieu triple sucres);
- ‡ Galerie API 20NE.

### **2.3.1 Le test TSI (milieu triple sucres) :**

#### **2.3.1.1 Principe**

Ce milieu permet d'étudier la fermentation de trois sucres (glucose, lactose, saccharose), d'apprécier la production ou non de H<sub>2</sub>S et de noter la production ou non de gaz à partir du glucose.

#### **2.3.1.2 Technique**

La technique consiste à ensemencer en stries serrées la pente de la gélose puis par piqure centrale le culot, la lecture se fait après 18 heures d'incubation à 37°C.

#### **2.3.1.3 Lecture**

L'interprétation se fait par :

1. Lecture du glucose et du gaz au niveau du culot : la fermentation du glucose se traduit par le virage au jaune du culot et la production de gaz se traduit par la formation ou non de bulles de gaz dans la masse du culot.
2. Lecture de la pente : la fermentation du glucose et /ou du saccharose se traduit par le virage au jaune de la masse du culot.
3. La production de H<sub>2</sub>S se traduit par le noircissement du milieu.

### **2.3.2 Galerie API 20NE**

#### **2.3.2.1 Principe**

La galerie API 20 NE se compose d'une galerie constituée de 20 microtubes contenant des milieux et substrats sous forme déshydratée.

Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

### **2.3.2.2 Technique**

#### ***Préparation de la galerie :***

- Mettre de l'eau distillée sur le fond de la boîte, en remplissant toutes les alvéoles ;
- Placer la galerie sur le fond de la boîte et la recouvrir ;
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.

#### ***Préparation de l'inoculum :***

- Ouvrir une ampoule d'API NaCl 0,85 % Médium (2 ml) ;
- A l'aide d'une pipette Pasteur, prélever 1 à 4 colonies identiques ;
- Réaliser une suspension d'opacité égale à 0,5 Mc Farland.

#### ***Inoculation de la galerie :***

- Remplir les tubes et non les cupules des tests NO<sub>3</sub> à PNPG avec la suspension précédente. Eviter la formation de bulles;
- Ouvrir une ampoule d'API AUX Médium et y transférer environ 200 µl de la suspension précédente. Homogénéiser;
- Remplir tubes et cupules des tests Glu à PAC;
- Remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignés (Glu, ADH, Urée);
- Refermer la boîte d'incubation et incuber à 37°C pendant 48 h.
- Après 48 h d'incubation, faire la révélation par les réactifs suivants : TDA (Tryptophane désaminase) Nit1 et Nit2 de la manière suivante :
  - ✓ Déposer 1 ou 2 gouttes de Nit1 ainsi que Nit2 dans NO<sub>3</sub>;
  - ✓ Déposer aussi 1 ou 2 gouttes de TDA dans TRP;
  - ✓ Après 5 mn on observe les différentes colorations.

### **2.3.2.3 Lecture**

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture (**Annexe.1**) et l'identification est obtenue à l'aide du tableau d'identification (**Annexe.2**).

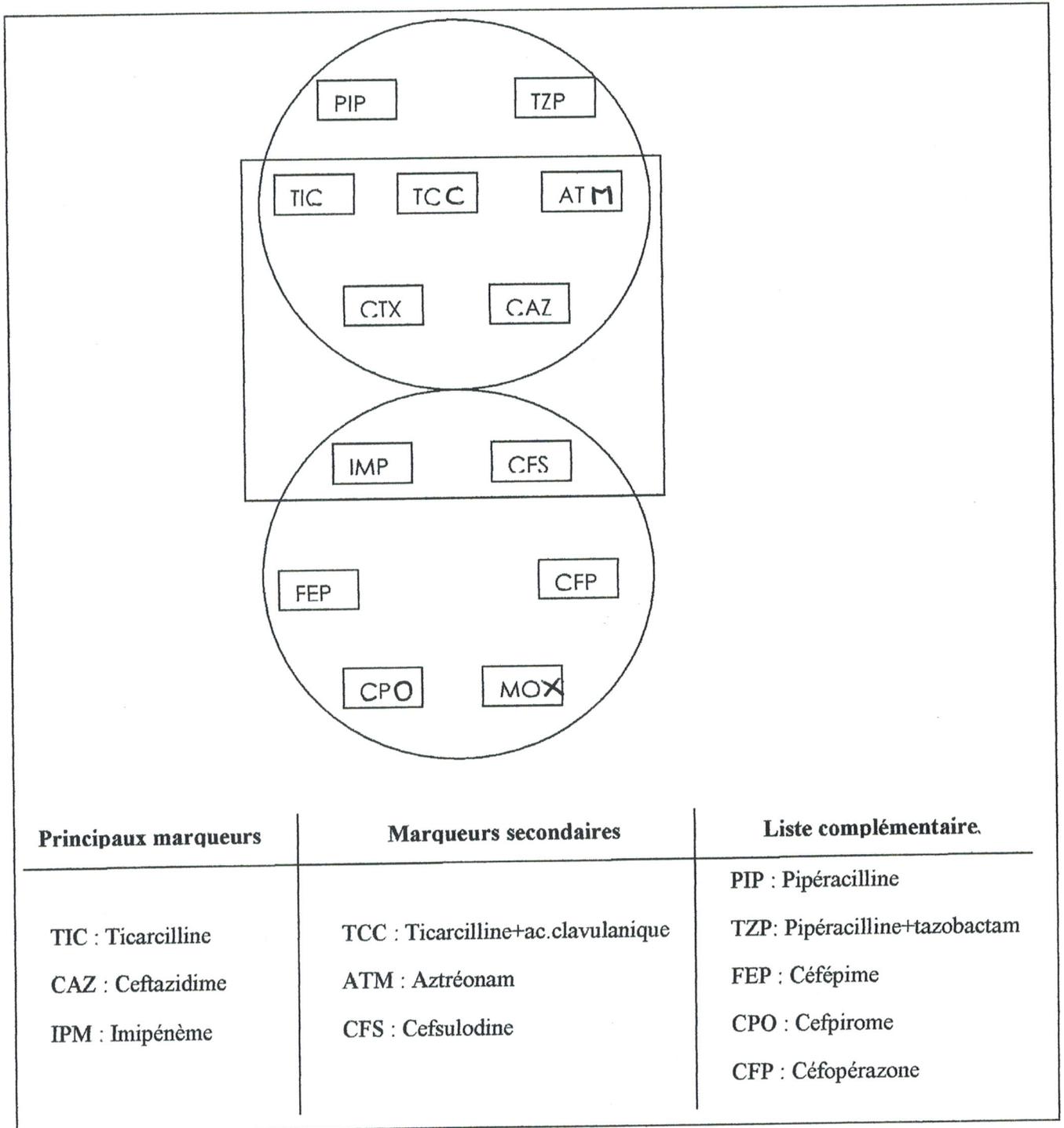
### 2.4 Antibiogramme (CASFM 2010 ; Vedel 2005)

#### 2.4.1 Principe

La technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différents antibiotiques à tester qui seront déposés à la surface d'une gélose uniformément ensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Chaque antibiotique diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine un gradient de concentration. Les bactéries croissent sur toute la surface de la gélose sauf là où elle rencontre une concentration d'antibiotique suffisante qui inhibe leur croissance. L'observation autour des disques d'une zone circulaire indemne de colonies bactériennes, appelée zone d'inhibition, permet de classer la souche étudiée en sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R) en comparant le diamètre d'inhibition à des valeurs critiques établies expérimentalement et diffusées par le Comité Français de l'Antibiogramme de la Société française de Microbiologie. Cette méthode permet aussi de mettre en évidence les interactions entre antibiotiques (synergie ou antagonisme).

#### 2.4.2 Technique

- A partir d'une culture pure, réaliser une suspension en ensemencant une colonie bien isolée dans 5 ml de BHIB et incubé 18h à 37°C.
- Réaliser une dilution de 1/100 dans 10 ml d'eau physiologique à 0.9%, puis homogénéiser la suspension bactérienne au vortex ; sa densité optique doit être de 0.08 à 0.10 à 625 nm équivalente à 0.5 Mac Farland.
- Ensemencer cette dilution par inondation sur des boîtes de pétri contenant 20 ml de gélose Mueller-Hinton, rejeter le surplus et laisser sécher les boîtes de pétri 15 à 20 min à l'étuve.
- Appliquer les disques d'antibiotique à l'aide d'une pince stérile. La disposition des  $\beta$ -lactamines a été réalisée selon le schéma de Vedel (**Figure.5**).
- Laisser les boîtes 20 mn à température ambiante pour permettre une pré-diffusion de l'antibiotique, puis les incubé pendant 18-24h à 37°C.



**Figure 5. Disposition des antibiotiques selon le schéma de Vedel (2005).**

### 2.4.3 Lecture

- La lecture se fait en mesurant avec précision les différents diamètres des zones d'inhibition. Comparer ces résultats aux valeurs critiques figurant dans l'**Annexe 3 et 4**, et classer les bactéries dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire ou Résistante.
- Interpréter les phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines.

## 2.5 Détermination des CMI en milieu solide (CASFM 2010 ; Courvalin et Soussy.1996)

### 2.5.1 Principe

La détermination précise de la CMI d'un antibiotique est parfois nécessaire pour compléter les données de l'antibiogramme. La méthode de référence (dilution en milieu gélosé) consiste à préparer une série de milieux gélosés contenant des concentrations croissantes d'antibiotiques.

### 2.5.2 Technique

- Pour chaque antibiotique, préparer une solution mère d'une concentration de 5120 mg/l, puis réaliser des dilutions sériées de progression géométrique de raison  $\frac{1}{2}$  (**Annexe.5**) ;
- Distribuer 2ml de chaque dilution d'antibiotique dans une série de boîtes de Pétri et 2ml d'eau distillée stérile dans une boîte de Pétri témoin ;
- Ajouter 18 ml de milieu Mueller Hinton gélosé maintenu en surfusion ;
- Bien mélanger et laisser solidifier ;
- Sécher les boîtes 30 minutes à l'étuve à 37°C ;
- Préparer des suspensions de  $10^8$  UFC/ml pour chacune des souches à tester, puis les diluer au 1/10 ;
- Ensemencer la suspension bactérienne par spot de 1 à 2  $\mu$ l, soit un inoculum de  $10^4$  UFC/spot ;
- Incuber 18 à 24 heures à 37°C.

- La souche de *P. aeruginosa* ATCC 27853 a été utilisée comme contrôle interne au cours de chaque série de détermination.

ATCC: American Type Culture Collection.

### 2.5.3 Lecture

- S'assurer de la croissance des souches au niveau de la boîte témoin ;
- Déterminer la plus faible concentration d'antibiotique ne montrant aucune croissance visible (la présence d'une ou de deux colonies ou d'un fin film n'est pas prise en considération);
- Les souches ont été catégorisées pour chacun des antibiotiques en fonction des concentrations critiques proposées par le CASFM (**Annexe.3 et 4**).

## 2.6 Test à la cloxacilline (De Champs et al., 2002)

### 2.6.1 Principe

La cloxacilline (Orbénine®) ajoutée en milieu Müller-Hinton inhibe *in vitro* très fortement toutes les céphalosporinases de la classe C d'Ambler. La restauration de l'activité des céphalosporines de troisièmes générations en présence de cloxacilline permet de confirmer la présence du phénotype céphalosporinase.

### 2.6.2 Technique

Réaliser un antibiogramme par diffusion sur milieux gélosés Mueller-Hinton supplémentés d'un inhibiteur: la cloxacilline de concentration finale de 500 µg/ml et de 1000 µg/ml.

### 2.6.3 Lecture

La lecture se fait en comparant les boîtes de Pétri contenant une gélose Müller-Hinton simple et celles contenant les géloses supplémentées de la cloxacilline. Le phénotype céphalosporinase se traduit par l'augmentation des diamètres d'inhibition d'au moins 8mm autour des disques des antibiotiques céphalosporines de troisième génération.

### 2.7 Test de synergie (Philippon et Arlet. 2006)

#### 2.7.1 Principe

Le test consiste à rechercher une image de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de  $\beta$ -lactamase (l'acide clavulanique) et un disque de céphalosporines de troisième génération (ceftriaxone, ceftazidime et cefotaxime) ou un monobactame (aztréonam).

#### 2.7.2 Technique

La recherche de  $\beta$ -lactamase à spectre étendue se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme, en disposant 2 disques d'antibiotiques : amoxicilline + acide clavulanique (AMC) et céphalosporine de troisième génération C3G (CTX, CAZ) à une distance de 20 à 30 mm sur gélose Muller-Hinton. Etant donné la multirésistance des souches concernées par cette étude, la recherche de synergies témoignant de la présence de BLSE a été réalisée sur gélose MH additionnée de cloxacilline avec une concentration finale de 1000 mg/l. Incuber pendant 18 heures à 37°C.

#### 2.7.3 Lecture

La production de BLSE se traduit par l'apparition d'une image de synergie ou bouchon de champagne entre le disque d'AMC et C3G (**Figure. 6**).

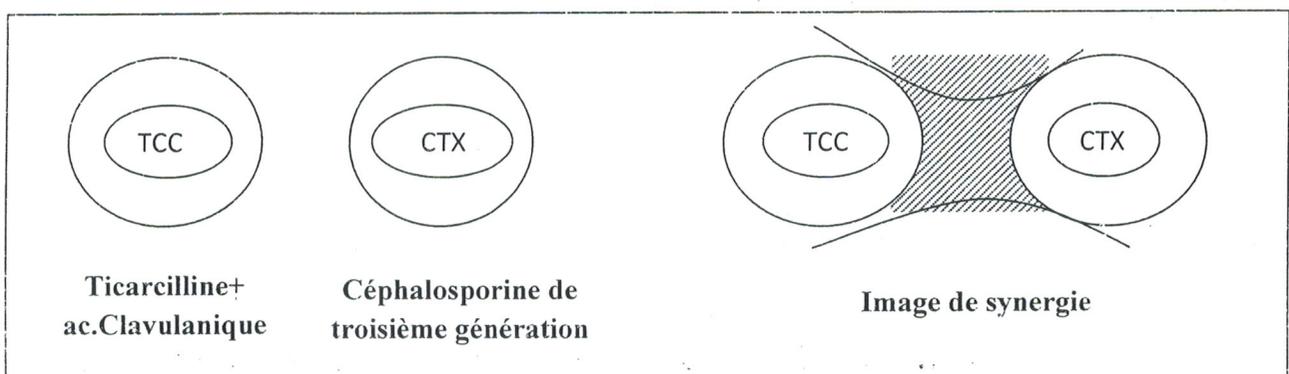


Figure 6. Schéma d'une image de synergie

### 2.8 Test de Hodge (Lee et al., 2001 ; Lee et al., 2003)

#### 2.8.1 Principe

Un disque d'imipénème est appliqué au centre d'une boîte de Mac Conkey préalablement ensemencée avec une souche de *Escherichia coli* sauvage (sensible aux carbapénèmes) afin d'obtenir une culture confluyente et un diamètre dans la zone de sensibilité autour de l'imipénème. Les souches à tester sont appliquées sur la gélose sous forme de stries déposées à partir du disque d'imipénème jusqu'à la périphérie de la boîte. Ce test permet de mettre en évidence l'hydrolyse de l'imipénème par les souches testées.

#### 2.8.2 Technique

- Ensemencer par écouvillonnage une suspension d'*Escherichia coli* 25922 de  $10^8$  UFC/ml sur gélose Mac Conkey ;
- Faire une strie de la souche à tester à partir d'une suspension du centre de la boîte vers la périphérie ;
- Sécher la boîte 15 minutes ;
- Déposer un disque d'imipénème au centre de la boîte ;
- Incuber 18 heures à 37°C.

#### 2.8.3 Lecture

La déformation du diamètre à l'intersection entre une strie et la culture d'*E. coli* signe la présence d'une hydrolyse des carbapénèmes par la souche testée (**Figure.7**). Cette méthode, bien que facile à réaliser, ne préjuge en rien de l'identification de la  $\beta$ -lactamase en cause. En outre, le test est parfois difficile à interpréter.

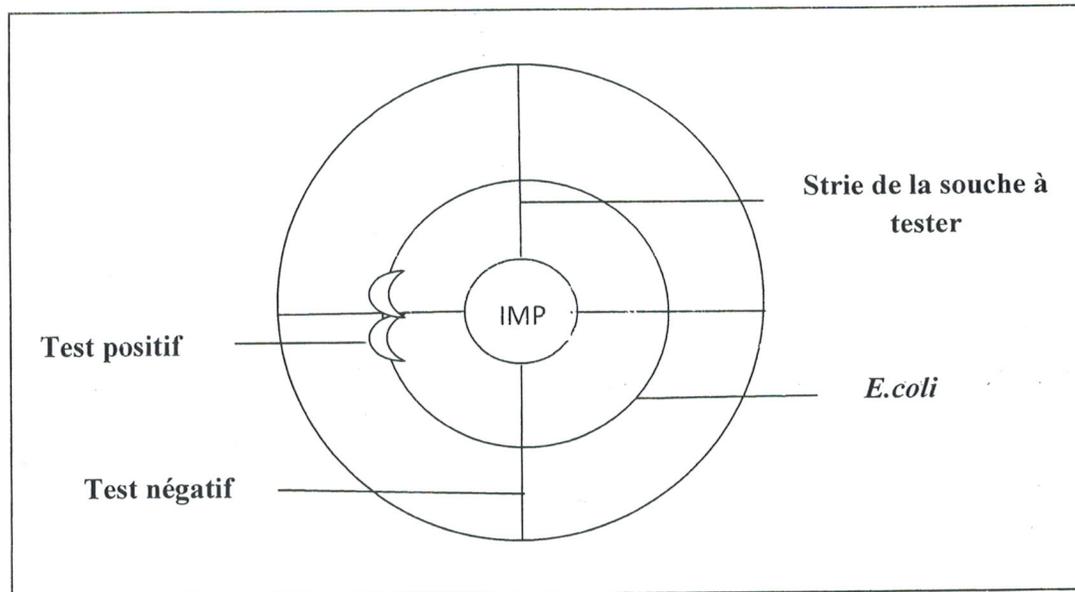


Figure 7. Lecture du test de Hodge (Lee et al., 2003)

## 2.9 Test à l'EDTA (Young et al., 2002 ; Walsh et al., 2005)

### 2.9.1 Principe

La recherche des métallo- $\beta$ -lactamases (MBL) a été effectuée sur les souches résistantes à l'IPM en mettant à profit la faculté de l'éthylène-diamin-tetra-acetic-acid (EDTA), chélateur bivalent à restaurer l'activité de l'IPM en chélatant les ions  $Zn^{2+}$  indispensables à l'activité de la MBL en la rendant inactive. Deux techniques phénotypiques ont été réalisées afin de rechercher la présence probable de MBL: le test IMP-EDTA et le test de synergie avec doubles disques (DDST).

### 2.9.2 Technique

- Ensemencer l'inoculum bactérien d'opacité 0,5 Mc Farland sur gélose Mueller-Hinton selon les recommandations du CA-SFM 2010 ;
- Déposer deux disques d'imipénème (10  $\mu$ g) à 20mm centre à centre l'un comme témoin, et sur l'autre, un volume contenant 4  $\mu$ l d'EDTA 0.5 M, pH 8 ;
- Déposer un autre disque d'IPM 10 $\mu$ g à 20mm centre à centre d'un disque non imprégné stérile sur lequel a été déposée 10  $\mu$ l d'EDTA 0.5 M, pH 8 ;
- Incuber 18 à 24 heures à 37°C.

- Un témoin positif correspondant à une souche de *Pseudomonas aeruginosa* productrice de la métallo- $\beta$ -lactamase VIM a été utilisé.

### 2.9.3 Lecture

Les souches dont le diamètre d'inhibition autour du disque IPM-EDTA était supérieur à celui obtenu avec le disque d'IPM seul pour la première technique, et dont on observe une synergie entre les deux disques pour la deuxième technique, ont été considérées comme souches productrices de MBL.

## 2.10 Conjugaison (Tichat, 1995)

### 2.10.1 Principe

C'est le transfert d'un plasmide conjugatif codant pour la résistance à un ou plusieurs antibiotiques d'une souche donatrice à une souche réceptrice. La souche réceptrice doit posséder un caractère de résistance chromosomique vis à vis d'un antibiotique auquel la souche donatrice est sensible. Afin de sélectionner les transconjugants (bactéries réceptrices ayant acquis le plasmide de résistance) tout en éliminant les bactéries donatrices et les bactéries réceptrices n'ayant pas acquis le plasmide de la donatrice, la sélection s'effectue en présence de 2 antibiotiques : l'un correspond à une des résistances transférées, l'autre correspond à la résistance non transférable de la souche réceptrice.

### 2.10.2 Technique

- Ensemencer la souche réceptrice et les souches donatrices en bouillon BHIB et incuber 18 à 24 heures à 37°C ;
- Réaliser un mélange donatrice réceptrice dans un rapport 1/2 ;
- Mélanger par inversement ;
- Incuber 18 à 24 heures ;
- Ensemencer le mélange donatrice réceptrice par stries sur un milieu de sélection ;

## *Matériel et méthodes*

---

- Vérifier la sélectivité des milieux de sélection en ensemençant la souche donatrice et la souche réceptrice par spot de 1 à 2 $\mu$ l sur la même boîte ;
- Incuber 24 heures à 37°C.

### **2.10.3 Lecture**

Réaliser des antibiogrammes et/ou des CMI sur les transconjugants.

## **2.11 Extraction de l'ADN plasmidique (Kado et Liu., 1981- modifiée)**

### **2.11.1 Principe**

C'est une technique qui permet l'extraction des plasmides de petite et de grande taille (>100kb). L'ADN plasmidique est libéré après la lyse bactérienne par un traitement SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) alcalin combiné à la chaleur. L'ADN chromosomique, les protéines, l'ARN de haut poids moléculaire et les débris cellulaires sont éliminés par l'action de solvants organiques. Enfin, l'ADN plasmidique se retrouve dans la phase aqueuse et sera analysé sur gel d'agarose.

### **2.11.2 Technique**

- Réaliser une culture bactérienne dans 5 ml de LB et incuber 24 heures à 37°C ;
- Centrifuger 3 ml de la suspension bactérienne à 14000 rpm pendant 2 minutes à température ambiante ;
- Eliminer le surnageant et sécher le culot ;
- Resuspendre le culot bactérien dans 100 $\mu$ l de tampon TE (Tris EDTA), bien vortexer ;
- Ajouter 200  $\mu$ l de solution de lyse ;
- Mélanger par inversion 5 à 10 fois ;
- Incuber à 55°C pendant 30 minutes en agitant de temps à autre ;
- Ajouter 2 volumes de phénol-chloroforme-isoamylalcool (soit un volume de 600 $\mu$ l) ;
- Mélanger par inversion 5 à 10 fois ;
- Centrifuger à 14000 rpm pendant 15 mn ;
- Récupérer la phase supérieure dans un nouveau microtube ;

- Ajouter 300 µl d'acétate de sodium 3 M pH 4,8 ;
- Mélanger par inversion 5 à 10 fois ;
- Centrifuger à 14000 rpm pendant 10 min à 4° C ;
- Récupérer le surnageant dans un nouveau microtube ;
- Ajouter 1 ml d'éthanol absolue à -20° C ;
- Précipiter 30 min à -20° C ;
- Centrifuger à 14000 rpm pendant 10 min à 4° C ;
- Laver le culot avec 500 µl d'éthanol 70% à température ambiante ;
- Centrifuger à 14000 rpm pendant 5 min à 4° C ;
- Eliminer le surnageant et bien sécher le culot ;
- Resuspendre le culot dans 40 µl de TE.

### **2.12 Electrophorèse d'ADN plasmidique (Sambrook et Russel., 2001)**

#### **2.12.1 Principe**

Cette technique permet de séparer des molécules chargées sous l'action d'un champ électrique. La migration des molécules d'ADN dépend principalement de leurs poids moléculaires, la concentration du gel d'agarose, la différence du potentiel appliqué et de la conformation de l'ADN.

#### **2.12.2 Technique**

##### **• Préparation du gel d'agarose**

- Pour un gel de 0.8%, dissoudre par chauffage jusqu'à ébullition, 1.6 g d'agarose (Sigma) dans 200 ml de tampon TBE 1X ;
- Refroidir la solution à 55° C dans un bain Marie ;
- Couler le gel dans un moule dont les 2 extrémités ont été préalablement fermées par un ruban adhésif ;
- Déposer un peigne dans le gel afin de réaliser les puits ;
- Laisser solidifier ;
- Retirer le peigne du gel et le ruban adhésif du moule ;
- Placer le moule avec le gel dans la cuve d'électrophorèse ;

## *Matériel et méthodes*

---

- Ajouter un volume de tampon TBE 1X dans la cuve préalablement remplie jusqu'à ce que le gel soit immergé (environ 1mm au dessus).
  - **Ensemencement**
- Répartir dans des tubes eppendorfs 40  $\mu$ l de chaque solution d'ADN en ajoutant 10  $\mu$ l de tampon de charge ;
- Mélanger à l'aide d'une micropipette;
- Déposer 25  $\mu$ l des mélanges dans les puis du gel.
  - **Migration**

Brancher le générateur après avoir raccordé la cuve environ 4 heures sous une tension de 90 volts.

- **Révélation**

Le gel est immergé dans une solution de TBE (Tris-Borate-EDTA) 1X contenant du BET (Bromure d'éthidium) à une concentration de 0.5  $\mu$ g/ml pendant 30 à 45 minutes à température ambiante. Le complexe fluorescent ADN-bromure d'éthidium est visualisé sous un transilluminateur à UV.

## *Résultats & Discussion*

### 1. Résultats

#### 1.1 Prélèvements

250 prélèvements ont été réalisés pendant la période d'étude de 8 mois (Octobre 2009 et Mai 2010), au niveau de divers services du C.H .U de Sidi Bel Abbes (**Tableau.5**).

**Tableau 5. Répartition des prélèvements en fonction des services et des sites de prélèvement**

Services	Nombre de prélèvements						
	Patients					Environnement	Total
	Urinaire	Trachéale	Plaie	Escarre	Divers		
Réanimation	23	20	3	1	9	29	85
Chirurgie	0	0	51	0	5	14	70
Traumatologie	0	0	10	0	0	15	25
UMC	1	1	13	0	1	2	18
Méd. Interne	0	0	2	9	0	3	14
Neurochirurgie	0	0	2	0	3	9	14
ORL	0	0	7	0	4	0	11
Divers	0	0	3	0	3	7	13
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>21</b>	<b>91</b>	<b>10</b>	<b>25</b>	<b>79</b>	<b>250</b>

**UMC** : Urgence Médicale et Chirurgicale.

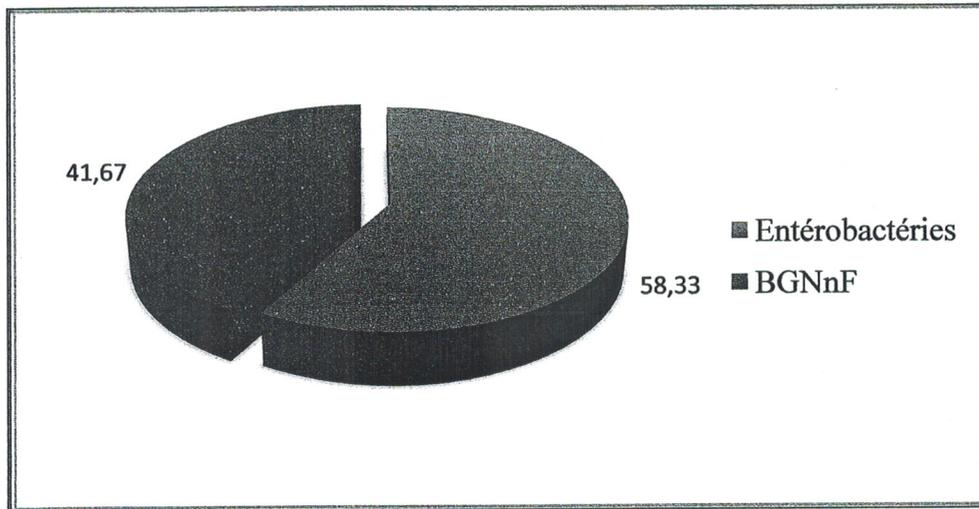
**ORL** : Oto-rhino-laryngologie.

**Divers services** : Néphrologie, Pédiatrie, Dermatologie, Urologie, Endocrinologie, Infectieux, Chirurgie infantile.

**Divers prélèvements**: Sonde gastrique, Drain, Valve cérébrale, Liquide céphalorachidien.

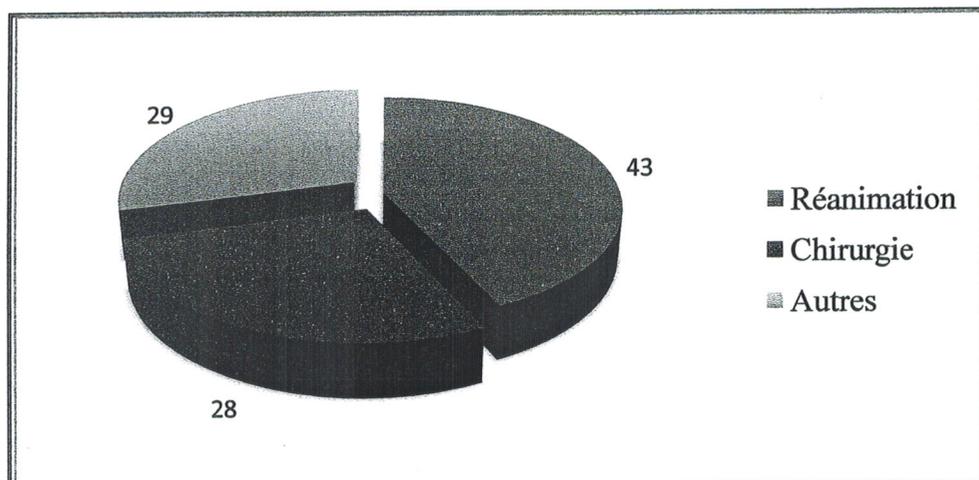
#### 1.2 Souches identifiées

Durant la période d'étude, 240 bacilles à gram négatif ont été répertoriés, dont 140 appartenant à la famille des entérobactéries et 100 au groupe des non fermentants, avec une fréquence d'isolement de 40% (**Figure.8**).



**Figure 8. Répartition des bacilles à gram négatif isolés à partir des prélèvements.**

Au niveau du service de la réanimation, 82 BGN ont été isolés, dont 52.44% correspond aux non fermentants (dont 65.12% de souches d'*Acinetobacter baumannii* et 34.88% de bacilles pyocyaniques) et 47.56% aux entérobactéries. Alors qu'au niveau du service de chirurgie, 65 BGN ont été isolés, dont 56.92% d'entérobactéries et 43.07% de BGNnF. Au niveau des autres services, le taux d'isolement des entérobactéries atteint un pourcentage de 68.8% et les non fermentants 31.2%. Par ailleurs, les services de réanimation et de chirurgie étaient les principales sources d'isolement des BGNnF avec un taux d'isolement de 43% et 28% respectivement (Figure.9).



**Figure 9. Répartition des BGNnF en fonction des services.**

## Résultats & Discussion

Dans notre étude, nous avons noté que les plaies représentaient le principal site d'isolement des BGNnF (34%), suivi de celui des prélèvements de l'environnement (24%) et des sondes urinaires (13%) (Figure.10).

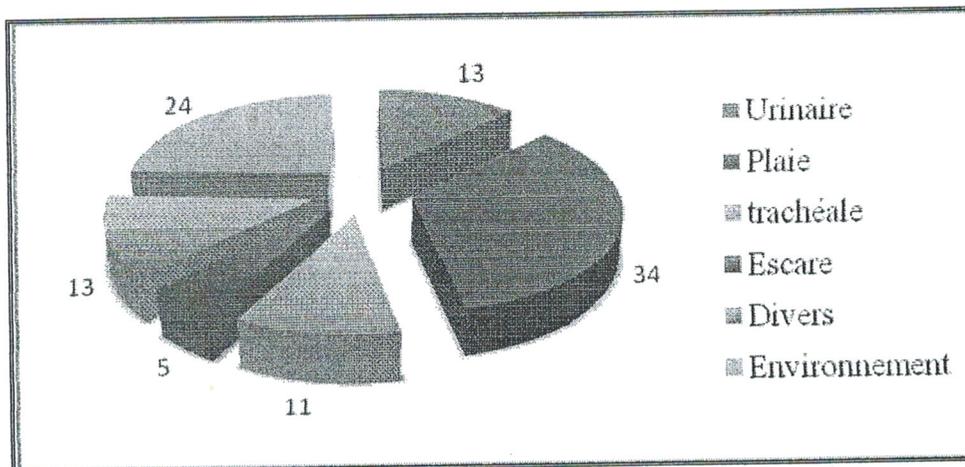


Figure 10. Répartition des BGNnF en fonction des sites de prélèvement.

Au total 100 bactéries non fermentantes ont été identifiées, 76 ont été isolées à partir de 171 prélèvements effectués sur les patients (44.4%) dont 37 *P. aeruginosa* (21.6%), et 39 *A. baumannii* (22.8%). A partir des 79 prélèvements de l'environnement, 24 souches ont été isolées (30.4%) dont 9 *P. aeruginosa* (11.4%), et 15 *A. baumannii* (19%) (Fig. 11 et 12).

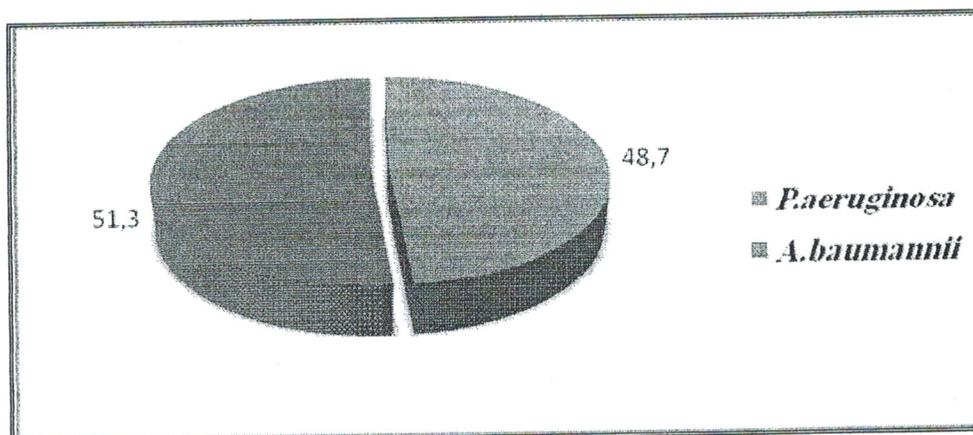


Figure 11. Répartition de *P.aeruginosa* et *A.baumannii* à partir des prélèvements de patients.

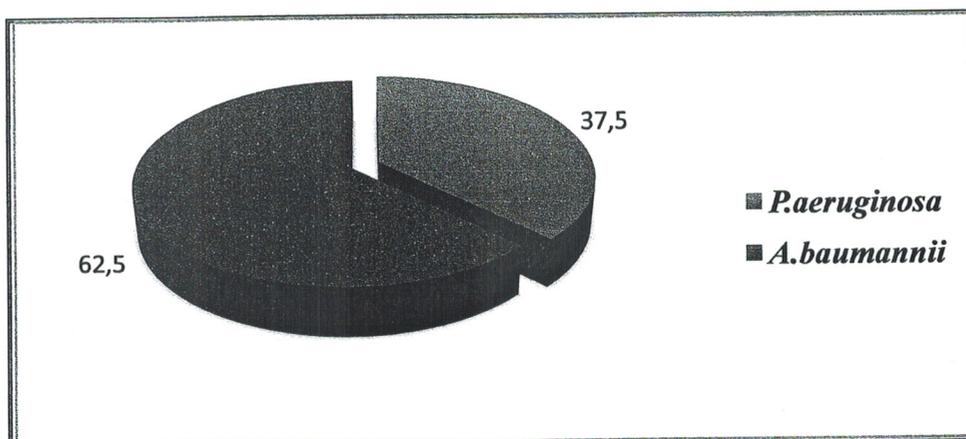


Figure 12. Répartition de *P.aeruginosa* et *A.baumannii* à partir des prélèvements de l'environnement.

### 1.3 Sensibilité aux antibiotiques

#### 1.3.1 *Acinetobacter baumannii*

Les souches d'*Acinetobacter baumannii* présentent une résistance importante vis-à-vis de la famille des  $\beta$ -lactamines, avec un taux de résistance de 100% à l'aztréonam et 94,44% à la pipéracilline, ticarcilline, ticarcilline+ ac. clavulanique, ceftazidime et céfépime. La pipéracilline+tazobactam est parmi les molécules les moins efficaces avec 88,88% de souches résistantes. L'imipénème est le moins touché avec un taux de résistance de 33,33 % (Figure.13, Annexe. 8).

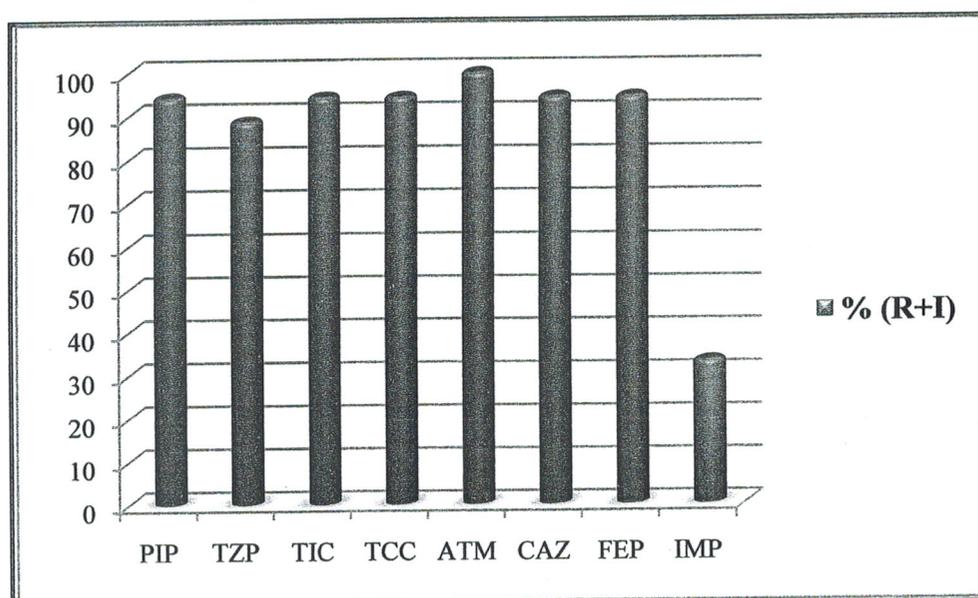


Figure 13. Taux de résistance aux  $\beta$ -lactamines des souches d'*A. baumannii*.

La résistance d'*A. baumannii* aux aminosides a connu depuis 1980, une évolution très brutale. Les souches présentent une forte résistance à la gentamycine (88.88%) et l'amikacine (74.07%). Seul la tobramycine conserve son activité avec un taux de résistance de 37.03%.

Pour les fluoroquinolones, on note une résistance assez importante à la ciprofloxacine avec un taux de 55.55%.

La colistine demeure le seul antibiotique potentiellement efficace avec 100% de souches sensibles (Figure.14, Annexe.8).

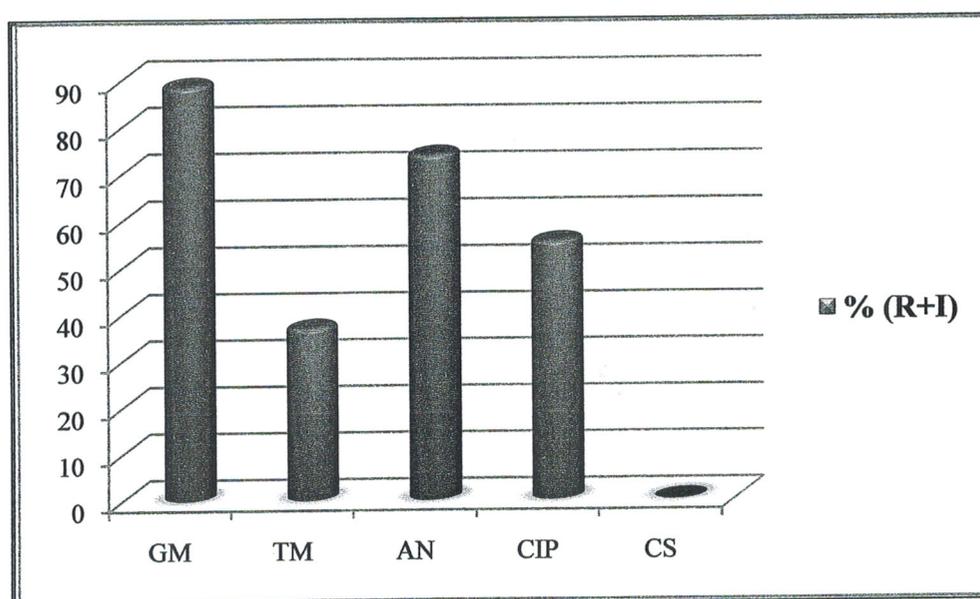


Figure 14. Taux de résistance aux aminosides et fluoroquinolones des souches d'*Acinetobacter baumannii*.

### 1.3.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Contrairement à la multirésistance des souches d'*Acinetobacter baumannii*, les bacilles pyocyaniques ont montré une bonne sensibilité aux antibiotiques testés.

On note une sensibilité totale à la pipéracilline, pipéracilline+tazobactam, céftazidime et à la céfépime. Les taux de résistance aux autres  $\beta$ -lactamines sont: ticarcilline (28.26%), ticarcilline+ac.clavulanique (47.82%), aztréonam (43.48%), imipénème (13.04%) (Figure.15, Annexe.11).

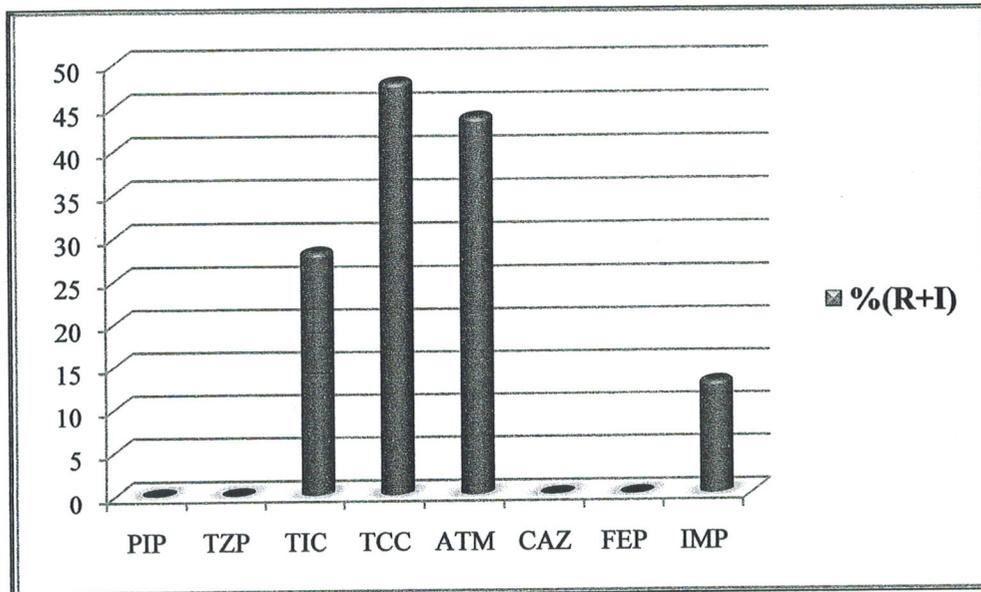


Figure 15. Taux de résistance aux  $\beta$ -lactamines des souches de *P. aeruginosa*.

Les aminosides : gentamicine, amikacine et tobramycine, sont actifs sur l'ensemble des bacilles pyocyaniques avec une sensibilité totale, contrairement à la kanamycine qui demeure inactive sur ces souches qui présentent une résistance totale (100%) due à une résistance naturelle vis-à-vis de cet antibiotique utilisé comme marqueur d'identification de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*.

Pour ce qui concerne les fluoroquinolones, un taux de résistance très important a été observé pour l'ofloxacine (97.82%). La ciprofloxacine garde une bonne activité avec seulement 10.87% de souches de sensibilité intermédiaire (Figure.16, Annexe.11).

Aucune résistance n'a été observée pour la colistine.

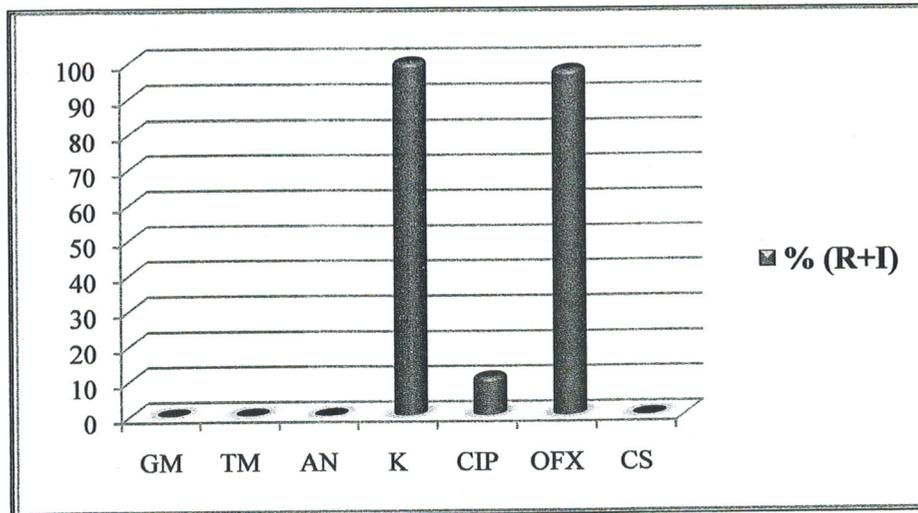


Figure 16. Taux de résistance aux aminosides et fluoroquinolones des souches de *Pseudomonas aeruginosa*

#### 1.4 Phénotypes de résistance aux $\beta$ -lactamines

##### 1.4.1 *Acinetobacter baumannii*

La majorité des souches étudiées sont résistantes à toutes les  $\beta$ -lactamines testées. Cette multirésistance a été confirmée par l'étude des CMI. Ces souches présentent une forte résistance à la céftazidime, la pipéracilline et la ticarcilline pour lesquelles la valeur de CMI retrouvée est supérieure à 512  $\mu\text{g/ml}$ . Elles présentent de même une forte résistance à l'imipénème (128  $\mu\text{g/ml}$ ) (Tableau.6, Annexe.10).

Tableau 6. Intervalles de CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) observés pour chacun des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines.

TIC	TCC	PIP	TZP	CAZ	FEP	ATM	IMP	Phénotypes observés
$\leq 16 > 64$	$\leq 4 > 8$	$\leq 4 > 8$	$\leq 4 > 8$	$\leq 2 > 8$				
<16	<16	4	0,5-4	0,5-4	1-4	8	<0,5-2	Sauvage
64->512	64->512	32->512	8-256	16->512	16-256	64-512	<1-2	Multirésistant (IPM sensible)
>512	>512	$\geq 512$	256->512	>512	64-512	128-512	32-128	Multirésistant

L'analyse du comportement de chaque souche vis-à-vis des  $\beta$ -lactamines testées nous a permis de distinguer 3 phénotypes de résistance: phénotype sensible (5.55%), phénotype multirésistant sensible à l'Imipénème (61.11%), phénotype multirésistant y compris à l'Imipénème (33.33%) (Figure.17).

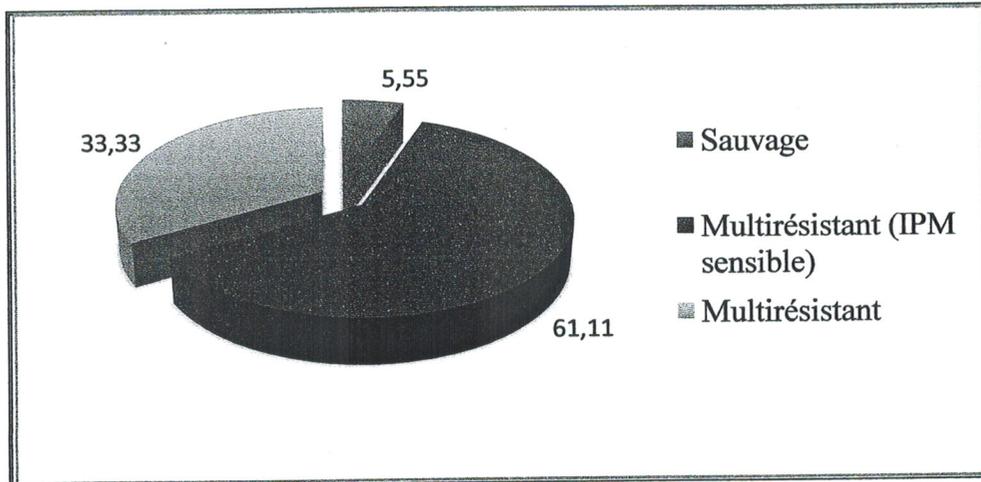


Figure 17. Répartition des phénotypes de résistance des souches d'*A. baumannii*.

La récupération de l'activité des C3G par la cloxacilline a permis de mettre en évidence la présence d'une AmpC, mais pour la majorité des souches testées la sensibilité à la céftazidime et à l'aztréonam n'était pas complètement restaurée sur gélose M.H additionné de cloxacilline, ce qui indique la présence d'un mécanisme additionnel à l'hyperexpression de céphalosporinase (Figure.18).

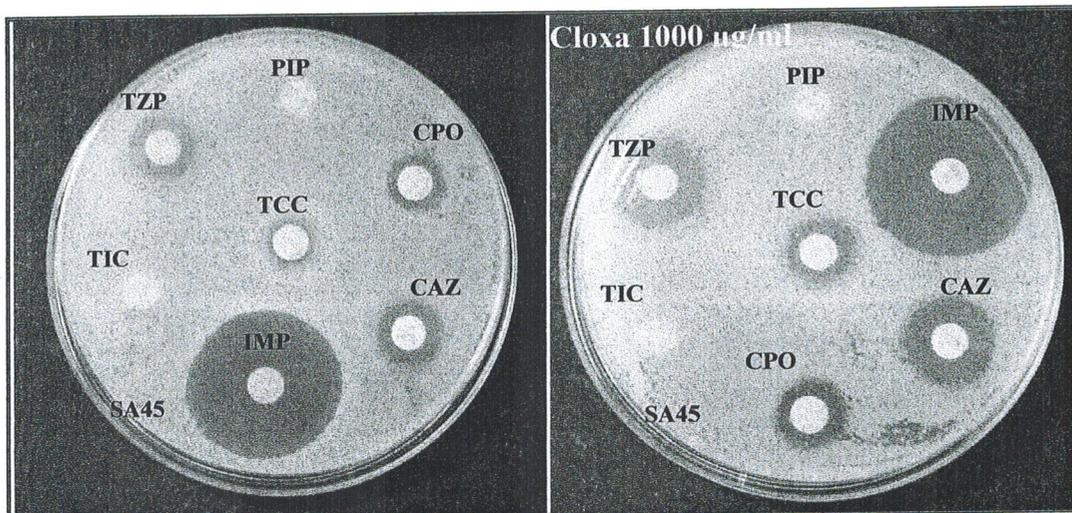
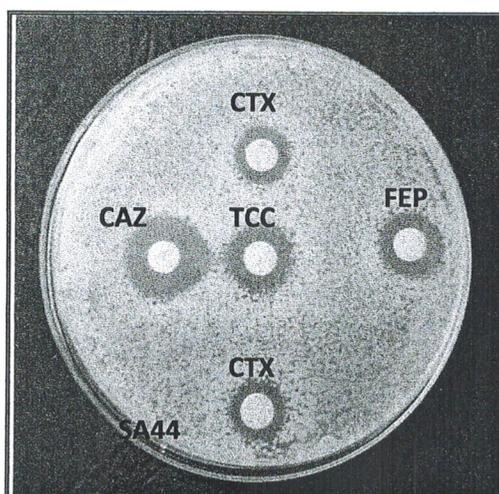


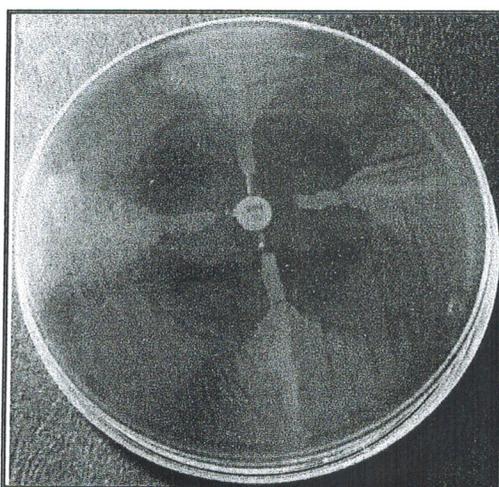
Figure 18. Résultat du test à la cloxacilline.

Toutes les souches étudiées ont donné un résultat négatif avec le test de synergie sur gélose MH additionnée de cloxacilline (**Figure.19**). La présence de BLSE peut être masquée par l'accumulation de plusieurs mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines.



**Figure 19. Résultat du test de synergie.**

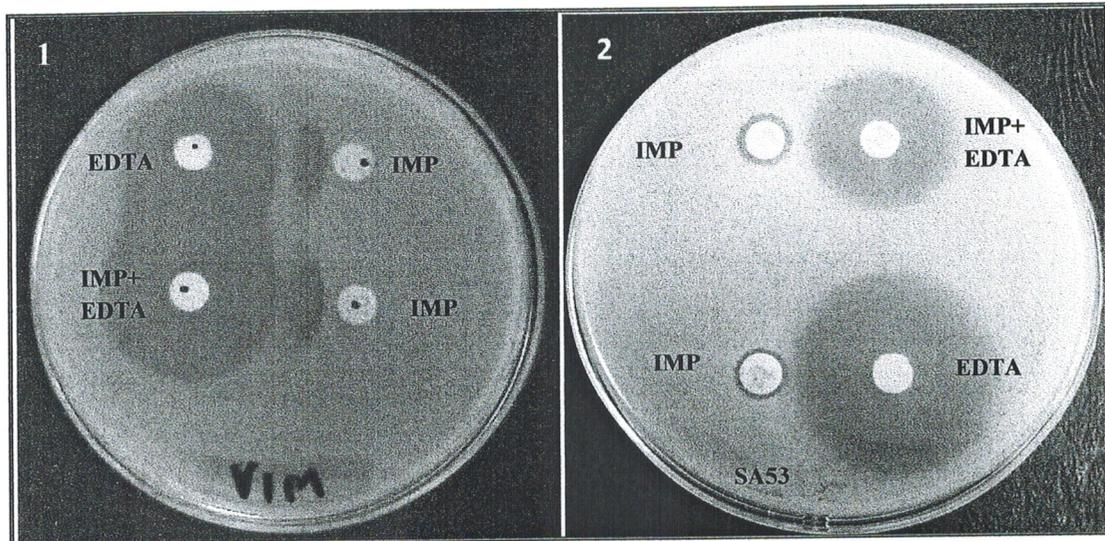
Le test de Hodge a permis de mettre en évidence la présence d'enzyme à activité carbapénémase chez les souches testées (**Figure.20**).



**Figure 20. Résultat du test de Hodge.**

Les carbapénémases induisent une résistance de haut niveau à toutes les  $\beta$ -lactamines, excepté l'aztréonam. La recherche de la métallo- $\beta$ -lactamase (MBL) a été effectuée sur les souches résistantes à l'IPM en mettant à profit la faculté de l'éthylène-diamin-tetraacetic-acid (EDTA), chélateur bivalent à restaurer l'activité de l'IPM en chélatant les ions  $ZN^{2+}$  indispensables à l'activité de la MBL en la rendant inactive.

L'activité des  $\beta$ -lactamases n'est pas inhibée par l'action de L'EDTA, donc les souches considérées ne possèdent pas de métallob- $\beta$ -lactamases permettant leur résistance à l'Imipénème (**Figure.21**).

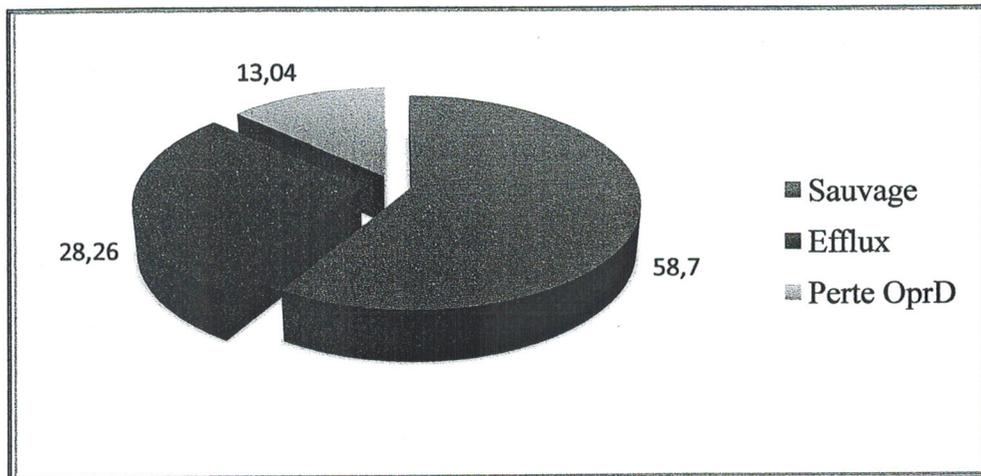


**Figure 21. Résultat du test à l'EDTA.**

- (1) Souche de référence productrice d'une métallob- $\beta$ -lactamase (VIM -1)
- (2) Souche d'*A.baumannii* testée

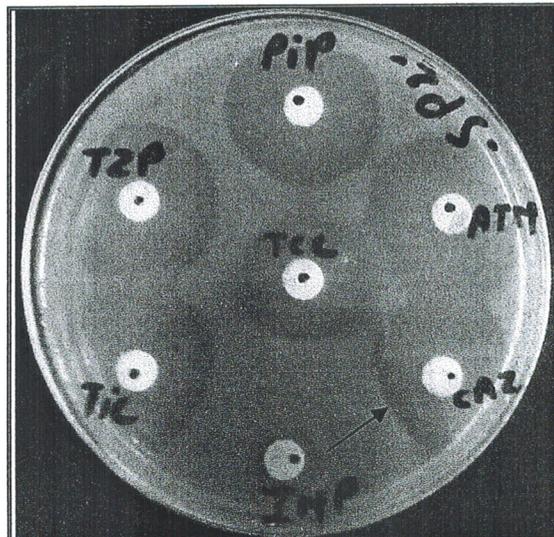
### 1.4.2 *Pseudomonas aeruginosa*

La répartition des phénotypes de résistance des bacilles pyocyaniques a révélé la présence unique de mécanismes de résistance non enzymatiques (41.3%), dont (28.26%) d'efflux lié à la résistance à la ticarcilline et (13.04%) de perte OprD liée à la résistance isolée à l'imipénème, alors que les autres  $\beta$ -lactamines restent actives. Le reste des souches était représenté par le phénotype sauvage (58.7%) (**Figure.22**).

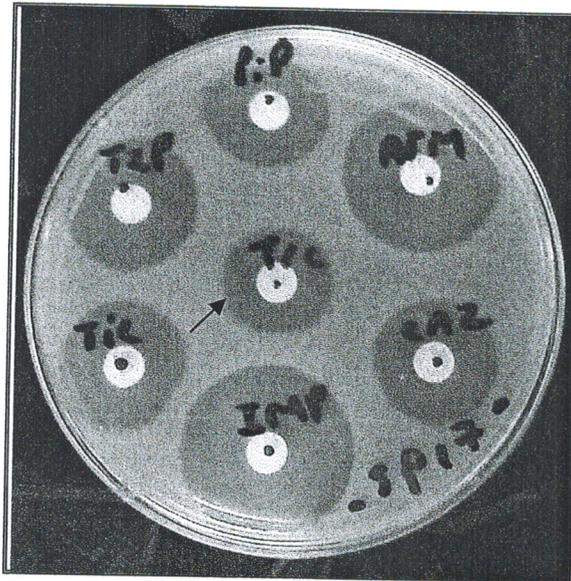


**Figure 22.** Répartition des phénotypes de résistance des souches de *P. aeruginosa* aux  $\beta$ -lactamines.

Le caractère inductible de la céphalosporinase s'est exprimé chez quelques souches par l'apparition d'une image d'antagonisme (Figure.23) entre l'imipénème et les céphalosporines à large spectre, ainsi que par la diminution de l'activité de la ticarcilline par l'acide clavulanique qui est un fort inducteur de la production de la céphalosporinase chez 47.82% des souches (Figure.24).



**Figure 23.** Image d'antagonisme chez une souche de *P. aeruginosa* de phénotype perte OprD.



**Figure 24. Image de l'induction de la céphalosporinase par l'acide clavulanique chez une souche de *P. aeruginosa*.**

### **1.5 Résistances associées chez les souches d'*Acinetobacter baumannii***

La tobramycine est l'aminoside le plus actif avec seulement 37% de souches résistantes. La résistance à la gentamicine et à l'amikacine est très élevée. L'antibiotype prédominant est l'antibiotype P1 représenté par 46.3 % des souches, suivit par l'antibiotype P2 avec un taux de 22.22% (Tableau.7).

L'association d'une résistance à l'amikacine et à la gentamicine est systématiquement retrouvée chez les souches résistantes à l'imipénème.

La résistance aux aminosides est associée à la résistance aux fluoroquinolones avec plus de 50% de souches résistantes à la ciprofloxacine.

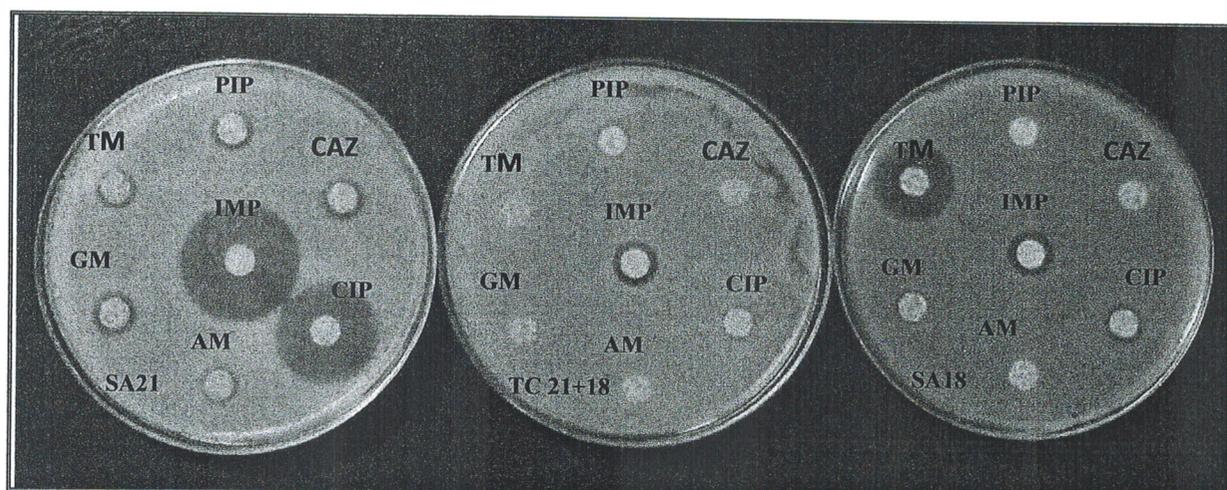
**Tableau 7. Profils de la résistance aux aminosides et aux fluoroquinolones d'*Acinetobacter baumannii***

Antibiotype	Nombre de souches	Antibiotique			
		TM	GM	AN	CIP
P1	25	S	R	R	R
P2	12	R	R	R	S
P3	8	R	R	S	S
P4	3	S	S	R	R
P5	3	S	S	S	S
P6	2	S	R	S	R
P7	1	S	R	S	S

### 1.6 Transfert d'antibiorésistance

Les conjugaisons ont été réalisées entre des souches d'*Acinetobacter baumannii* réceptrices résistantes à la tobramycine et des souches donatrices résistantes à l'imipénème, gentamicine, amikacine et à la ciprofloxacine.

L'analyse des profils de résistance des transconjugants par la méthode de diffusion (**Figure.25**) et de dilution (**Tableau.8**) en milieu solide a permis de mettre en évidence le transfert de gène codant pour la résistance à l'imipénème et à la ciprofloxacine.



**Figure 25. Phénotype de résistance d'un transconjugant**

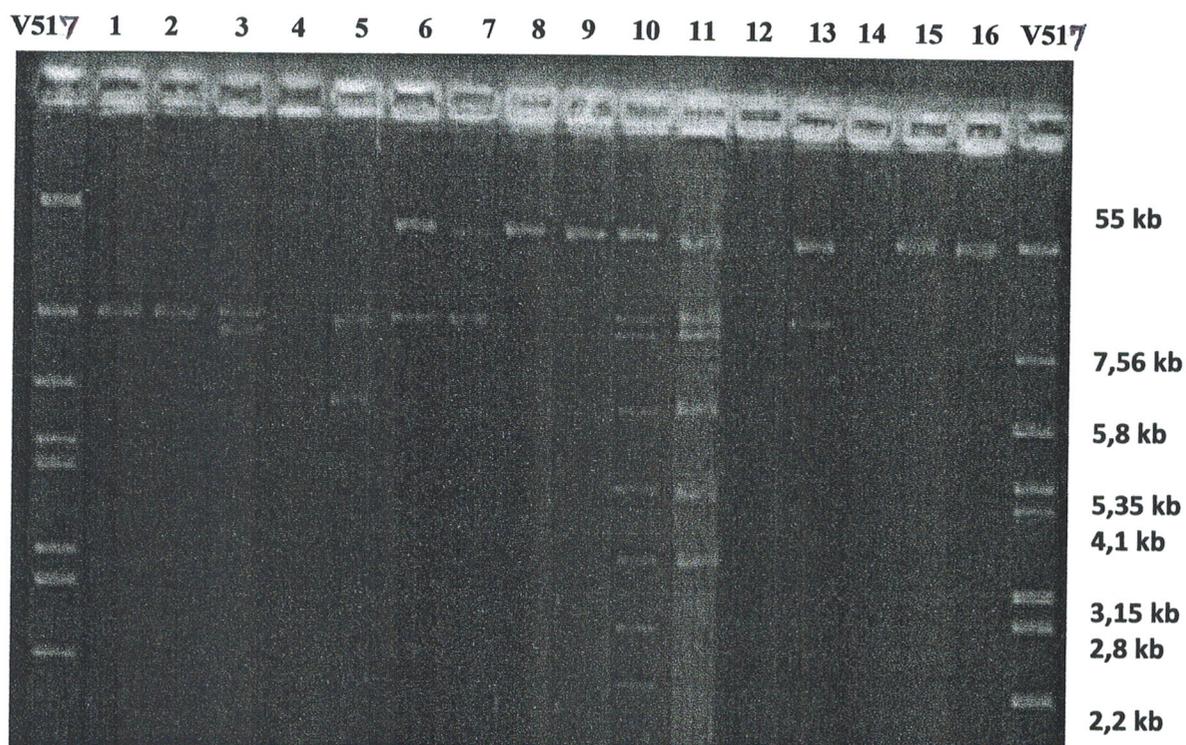
(SA21 : souche réceptrice (R), SA18 : souche donatrice (D), TC 21+18 : Transconjugant)

Tableau 8. Résultats de CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) obtenus pour les transconjugants

Transconjugants	PIP	IMP	CAZ	GM	TM	CIP
	$\leq 16 > 64$	$\leq 2 > 8$	$\leq 4 > 8$	$\leq 4 > 4$	$\leq 4 > 4$	$\leq 1 > 1$
TC 21+18	512	64	$> 512$	512	64	16
TC 23+17	512	64	$> 512$	512	64	16
TC 4+31	$> 512$	64	128	128	64	128
TC 12+24	512	64	256	512	64	128

### 1.7 Visualisation des plasmides sur gel d'agarose :

La recherche des plasmides est un complément nécessaire pour la comparaison et le suivi de l'évolution des souches pathogènes. Les souches d'*Acinetobacter baumannii* ayant fait l'objet de conjugaison hébergent des plasmides classés en huit profils plasmidiques. Ces profils comprennent des bandes plasmidiques de taille variable et n'ont pas de relation évidente avec les phénotypes de résistance aux antibiotiques observés (Figure.26).



**Figure 26. Visualisation des plasmides sur gel d'agarose.**

V 517 (souche de référence) ; 1 (SA24) ; 2 (TC 12+24) ; 3 (SA12) ; 4 (SA17) ; 5 (TC 23+17) ; 6 (SA23) ; 7 (SA31) ; 8 (TC 4+31) ; 9 (SA4) ; 10 (SA18) ; 11 (TC 21+18) ; 12 (SA21) ; 13 (SA38) ; 14 (SA49) ; 15 (SA29) ; 16 (SA43).

### 2. Discussion

Les BGNnF sont des agents pathogènes opportunistes responsables d'une part importante des infections nosocomiales.

Dans une étude récente, réalisée au sein du même laboratoire (Ayad. 2010; Mesli. 2010), 234 bacilles à Gram négatif ont été isolés au niveau du CHU de Tlemcen avec un taux d'isolement de 52,14% de BGNnF supérieur à celui des entérobactéries (47,86%). Dans notre étude 240 bacilles à Gram négatif ont été isolés, avec un taux d'isolement de 58,33% pour les entérobactéries supérieur à celui des BGNnF (41,67%).

De nombreuses études ont rapporté la prédominance des infections à *Acinetobacter baumannii* dans des services de réanimation (Bergogne Berezin et Towner. 1996). Ces souches représentent 22,5% des bacilles à Gram négatif identifiés dans notre étude, soit 34,14% si on ne considère que le service de réanimation. Le taux d'isolement des souches d'*Acinetobacter baumannii* est supérieur à celui retrouvé dans une étude marocaine représentant 6,74 % de l'ensemble des bacilles à Gram négatif, et 14,12 % si on ne considère que les services de réanimation (Lahsoune et al., 2007).

La fréquence d'isolement des souches d'*A. baumannii* et de *P. aeruginosa* est liée au caractère nosocomial fréquent dans les établissements de santé, en particulier dans le cadre des infections associées aux soins, elle suggère une transmission manuportée et un problème de maîtrise de l'environnement hospitalier. En effet, ces deux espèces sont des bactéries nosocomiales par excellence, avec un réservoir essentiellement environnemental hospitalier, une capacité d'acquérir et de cumuler facilement plusieurs mécanismes de résistance. Ces infections sont très favorisées par la mise en place de matériels invasifs comme les sondes vésicales pour les infections urinaires, les cathéters intravasculaires pour les bactériémies et les sondes d'intubation pour les pneumopathies nosocomiales chez les patients ventilés mécaniquement. Ces dispositifs altèrent les défenses naturelles de l'organisme et créent une brèche qui favorise la contamination de milieux normalement stériles.

Dans notre étude, nous avons noté que les plaies post-opératoires sont le principal site d'isolement des souches de BGNnF, pour les souches d'*A. baumannii*, comme pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Dans une étude menée au Maroc dans la région de Mahdia, le pourcentage d'isolement des souches d'*Acinetobacter baumannii* est plus élevé dans les prélèvements effectués au niveau des voies aériennes (Ben Haj Khalifa et Khedher. 2009).

La résistance des bacilles à Gram négatif non fermentants aux antibiotiques pose un grand problème au niveau du CHU de Sidi Bel Abbes. Le premier fait marquant de notre étude est le taux de résistance très élevés des souches d'*Acinetobacter baumannii* aux différentes classes d'antibiotiques testées. Une étude asiatique rapporte des résultats similaires avec des taux très élevés de résistance aux antibiotiques (Young Kyoung et al., 2009). La capacité de cette espèce à persister et à résister au niveau de l'environnement hospitalier et sa capacité à cumuler des facteurs de résistance, aboutissant rapidement à une impasse thérapeutique, expliquent les taux de résistance constatés.

Les souches étudiées sont résistantes à toutes les  $\beta$ -lactamines testées, avec un taux de résistance de 100% pour l'aztréonam, 94, 44% pour la pipéracilline, ticarcilline, ticarcilline+ac.clavulanique, céftazidime et la céfépime, et 88,88% de souches résistantes à la pipéracilline+tazobactam. Ce résultat concorde avec une étude tunisienne réalisée à l'hôpital universitaire Sahloul (Mansour et al., 2008). L'imipénème est le moins touché avec un taux de résistance de 33,33%, ce pourcentage est plus élevé par rapport à une étude marocaine (23,8%) (Elouennass et al., 2003), et inférieur à 57%, résultat décrit par Ait el kadi et al., en 2006.

Pour les mécanismes de résistance acquise à l'imipénème, deux types d'enzymes ont été décrits : les Métallo- $\beta$ -lactamases et les oxacillinases à activité carbapénémase. La recherche de la production de MBL par les techniques phénotypiques s'est révélée négative. Une analyse génotypique par PCR réalisée au niveau du laboratoire de bactériologie de l'hôpital Tenon à Paris sur quelques souches d'*Acinetobacter baumannii* a permis d'identifier un gène (OXA-40) codant pour la production de carbapénémase de classe D.

D'autres études similaires effectuées sur la même espèce ont permis l'identification d'oxacillinases appartenant au groupe OXA-23 (Mesli. 2010) et au groupe OXA-58 (Drissi et al., 2010) au niveau du CHU de Tlemcen, en Tunisie (Poirel et al., 2008) et en Turquie (Kulah et al., 2010).

De même, la résistance croisée à d'autres classes d'antibiotiques (aminosides et fluoroquinolones) est très fréquente, ce qui complique la prise en charge thérapeutique.

Pour les aminosides, la résistance d'*A. baumannii* a connu depuis 1980, une évolution très brutale. Elle affecterait selon les études (Joly-Guillou. 1997) 70 à 85 % des souches pour les 4 principales molécules d'aminosides : amikacine, gentamicine, tobramycine et nétilmicine. Dans notre étude, le taux de résistance des souches d'*Acinetobacter baumannii* à l'amikacine et la gentamicine est très élevé, respectivement 74,07% et 88,88%. La tobramycine est l'aminoside le moins touché et le plus actif avec 37,03% de souches résistantes.

La résistance d'*A. baumannii* aux fluoroquinolones est très fréquente. On a constaté une résistance élevée à la ciprofloxacine, soit 55,55%. Ce résultat est inférieur à celui d'une étude marocaine, soit 68 à 72 % entre 1996 et 2001 (Elouennass et al., 2001).

L'acquisition de la résistance à l'imipénème et à la ciprofloxacine chez les souches d'*Acinetobacter baumannii* après conjugaison et visualisation du contenu plasmidique par électrophorèse, met en évidence la dissémination du matériel génétique, de nature plasmidique, codant pour ces deux résistances.

Les taux de résistance des isolats de *P. aeruginosa* sont très inférieurs à ceux observés pour *Acinetobacter baumannii*. La même observation a été notée dans l'étude d'Elouennass et al. en 2008. Aucune résistance n'a été observée pour la pipéracilline, pipéracilline+tazobactam, et la céfépime. On note des taux de résistance de 43.8% à l'aztréonam et 47.82% et la ticarcilline+ac.clavulanique.

La résistance à l'imipénème, soit 13,04%, est codée par un mécanisme non enzymatique vu la sensibilité de ces souches à la céftazidime et la pipéracilline.

Cette résistance pourrait être due à un défaut de pénétration suite à une perte de la porine OprD ou d'une hyperproduction de la céphalosporinase chromosomique AmpC (Deplano et al., 2005; Kohler et al., 1999).

Chez *P. aeruginosa* la résistance à l'imipénème a souvent été liée à une perte de la porine D2 (OprD) (Trias et Nikaido. 1990). Au cours d'une étude en 2001 sur la résistance aux antibiotiques des bactéries isolées de prélèvements cliniques dans les services de réanimation européen, la fréquence globale de résistance à l'imipénème de *P. aeruginosa* a été estimée à 38 % (Hanberger et al., 2001).

Les bacilles pyocyaniques présentent un taux de résistance de 28,26% à la ticarcilline, comparé aux résultats d'une étude française où 42% des souches *P.aeruginosa* étaient de sensibilité intermédiaire ou résistantes à la ticarcilline (Cavallo et al., 2001). Plus du tiers des résistances à cet antibiotique est lié à des résistances non enzymatiques, essentiellement par un mécanisme d'efflux actif (Cavallo et al., 1997).

La grande majorité des souches *Pseudomonas aeruginosa* isolées dans notre étude appartient au phénotype sauvage (58,7%), le reste appartient au groupe « résistance non enzymatique » qui rassemble (28,26%) d'efflux et (13,04%) de perte OprD.

Aucun mécanisme de résistance enzymatique lié à la production d'une  $\beta$ -lactamase acquise de type pénicillinase n'a été détecté, comparé aux résultats d'une étude effectuée au niveau du même laboratoire (Drissi et al., 2008).

Les autres classes d'antibiotiques ont gardé une très bonne activité sur les bacilles pyocyaniques.

Au cours de notre étude, aucune souche résistante à la colistine n'a été isolée. Par ailleurs, l'augmentation de l'usage de cette molécule pour le traitement des infections à souches multirésistantes d'*A. baumannii* serait à l'origine de l'apparition de résistances (Manikal et al., 2000).

# *Conclusion*

## Conclusion

---

Les BGNnF sont naturellement résistants à de nombreux antibiotiques et peuvent acquérir de nombreux mécanismes de résistance causant de réelles difficultés thérapeutiques.

L'étude de l'antibiorésistance des bacilles à Gram négatif non fermentants au niveau des divers services du CHU de Sidi Bel Abbas a permis d'apprécier l'efficacité des antibiotiques utilisés.

La pression de sélection exercée par l'usage abusif des antibiotiques à large spectre est à l'origine de l'émergence préoccupante de souches d'*A. baumannii* multirésistantes. En plus de l'antibiothérapie, les procédures invasives (pose de sonde, intubation, ventilation artificielle, intervention chirurgicale) sont d'importants éléments à considérer.

Toutefois, aucune résistance à la colistine n'a été observée. Par ailleurs, l'augmentation de l'usage de cette molécule pour le traitement des infections à souches multirésistantes d'*A. baumannii* pourrait favoriser l'apparition de mutants résistants.

Un grand nombre d'antibiotiques reste efficace sur les bacilles pyocyaniques. La présence unique de résistances non enzymatiques des souches de *P. aeruginosa* a été attribuée à la résistance à l'imipénème pour le phénotype perte OprD, et à la résistance à la ticarcilline concernant le phénotype d'Efflux.

L'analyse du contenu plasmidique est un complément nécessaire pour la comparaison et le suivi de l'évolution des souches pathogènes. Il serait intéressant de faire appel à des méthodes génotypiques comme l'ECP (électrophorèse en champ pulsé) et la PCR (polymérase chaîne réaction) qui se révèlent indispensables à la meilleure caractérisation épidémiologique des souches hospitalières pour déterminer l'origine clonale ou non d'une souche.

L'amélioration du pronostic de ces infections nosocomiales repose sur une antibiothérapie de première intention précoce et efficace, une surveillance régulière de la résistance aux antibiotiques afin d'adapter les schémas thérapeutiques adéquats et la sensibilisation du personnel soignant pour une application rigoureuse des mesures d'hygiène susceptible d'éviter leur dissémination.

## *Références bibliographiques*

1. **Ait el kadi M, Aghrouch M, Seffar M, El harti J, bouklouze A, Cherrah Y. (2006).** Prévalence des souches d'*Acinetobacter baumannii* et de *Pseudomonas aeruginosa* résistantes à l'imipénème par production de métallob-lactamases. *Med Mal Infect.*36:386–9.
2. **Alsultan A A, Hamouda A, Evans B A, Amyes S G. (2009).** *Acinetobacter baumannii*: emergence of four strains with novel blaOXA-51-like genes in patients with diabetes mellitus. *J Chemother.*21:290–5.
3. **Ambler R. (1980).** The structure of  $\beta$ -lactamases *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 289(1036), 321-331.
4. **Arlet G, Philippon A . (2003).** Les nouvelles  $\beta$ -lactamases a l'aube du troisième millénaire. Ed Elsevier. *Revue Française des Laboratoires.* N°352.
5. **Aubron C, Poirel L, Fortineau N, Nicolas P, Collet L, Nordmann P. (2005).** Nosocomial spread of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the metallo-beta-lactamase VIM-2 in a hematology unit of a French hospital. *Microb Drug Resist.* 11: 254-259.
6. **(a) Avril J L, Dabernat H, Denis F, Monteil H. (2000).** Bactériologie clinique. Paris : Ellipses, 2000 ; pp 602.
7. **(b) Avril J L, Dabernat H, Denis F, Monteil H. (2000).** Bactériologie clinique. 3ème Ed. Ellipses. pp 316.
8. **Bagge N, O Ciofu, M Hentzer, J I Campbell, M Givskov, et N Holby. (2002).** Constitutive high expression of chromosomal betalactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in ampD. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 3406-3411.
9. **Barrial K et Scotet J.(2006).**Classification raisonnée des b-lactamases chez les bacilles gram négatif. Thèse DES Bactériologie. Perspectives d'évolution. Encadrement Dr Tigaud S. pp3-4.
10. **Baron E J, Pfaller M A, Tenover F C, Yolken R H, Murray P R. (1995).** Manual of clinical microbiology Graevenitz, AV. *Acinetobacter, Alcaligenes, Moraxella*, and other non-fermentative Gram-negative bacteria. In: Manual of clinical microbiology. Washington DC: American Society for Microbiology. pp 520–2.

11. **Ben Haj Khalifa A et Khedher M. (2009).** Profil de sensibilité aux antibiotiques des souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées dans la région de Mahdia. Médecine et maladies infectieuses Ed Elsevier. Masson (Article in Press). Modele + MEDMAL-2925; No. of Pages 3.
12. **Bergmans DC, Bonten MJ, Van Tiel FH, Gaillard CA, Van der Geest S, Wilting RM, et al. (1998).** Cross-colonization with *Pseudomonas aeruginosa* of patients in an intensive care unit. *Thorax*; 53:1053–8.
13. **Bergogne Berezin et Towner. (1996).** *Acinetobacter.spp* as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev*:148–6.
14. **Berthelot P, Grattard F, Mallaval F O, Ros A, Lucht F, Pozzetto B. (2005).** Épidémiologie des infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* et *Stenotrophomonas maltophilia*. Ed Elsevier. Pathologie Biologie 53:341–348.
15. **Bertrand X, Bailly P, Blasco G, Balvay P, Boillot A, Talon D. (2000).** Large outbreak in a surgical intensive care unit of colonization or infection with *Pseudomonas aeruginosa* that overexpressed an active efflux pump. *Clin Infect Dis*;31(4):E9–E14.
16. **Blanc DS, Petignat C, Janin B, Bille J, Francioli P. (1998).** Frequency and molecular diversity of *Pseudomonas aeruginosa* upon admission and during hospitalization: a prospective epidemiologic study. *Clin Microbiol Infect*;4:242–7.
17. **Bonnet R. (2004).** Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(1):1-14.
18. **Bonten MJ, Austin DJ, Lipsitch M. (2001).** Understanding the spread of antibiotic resistant pathogens in hospitals: mathematical models as tools for control. *Clin Infect Dis*;33(10):1739–46.
19. **Bou G, Cervero G, Dominquez MA, Quereda C, Martinez-Beltran J. (2000).** Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of beta-lactamases. *J Clin Microbiol*;38:3299–305.

20. **Bratu S, Landman D, Martin DA, Georgescu C, Quale J. (2008).** Correlation of antimicrobial resistance with B-lactamases, the OmpA-like porin, and efflux pumps in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* endemic to New York City. *Antimicrob Agents Chemother*;52:2999-3005.
21. **Brown S et Amyes S. (2006).** OXA b-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. *J Antimicrob Chemother.* 57:1–3.
22. **Bryskier A. (1999).** Antibiotiques agents antimicrobiens et antifongique. Paris. Ed Ellipses.
23. **Bush K.I, Jacoby G.A et A. A. Medeiros. (1995).** A functional \ classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure- *Antimicrob Agents Chemother.* 39(6): 1211-1233.
24. **Carbon C, Régnier B, Saimot AG, Vildé JL, Yeni P. (1995).** Médicaments antiinfectieux. Ed Flammarion Médecine-sciences.
25. **Carbonne A, Naas T, Blanckaert K, Couzigou C, Cattoen C, Chagnon J-L, et al. (2005).** Investigation of a nosocomial outbreak of extended-spectrum blactamase VEB-1 producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a hospital setting. *J Hosp Infect*; 60:14–8.
26. **Carpentier JP, Morillon M, Petrognani R, Cavallo JD. (2003).** Infections à bacille pyocyanique. *Encycl Med Chir.* 8-025-B-50.
27. **CA-SFM. (2010).** Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Sur le lien : <http://www.sfm.asso.fr/>.
28. **Cavallo JD, Plesiat P, Couetdic G, Leblanc F, Fabre R. (1997).** Mechanisms of b-lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: prevalence of OprM-overproducing strains in a French multicentre study. *J Antimicrob Chemother*; 50:1039–43.
29. **Cavallo J.D, Leblanc F, Fabre R, Fourticq-Esqueöute A, GERPB. (2001).** Surveillance de la sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques en France et distribution des mécanismes de résistance aux bêtalactamines : étude GERPB 1999. *Pathol Biol* ; 49 : 534-9.
30. **Cavallo JD, Fabre R, Jehl F, Rapp C, Garrabé E. (2004).** Bêta-lactamines. *EMC Mal Infect*;1(3):129–202.

31. **Chaabane A, Aouama K, Boughattas N.A, Chakroun M. (2009).** Allergie aux bêtalactamines : mythe et réalités. Ed Elsevier Masson. Médecine et maladies infectieuses (39) 278–287.
32. **Chang LL, Chen HF, Chang CY, Lee TM, Wu WJ. (2004).** Contribution of integrons, and SmeABC and SmeDEF efflux pumps to multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. J Antimicrob Chemother. 53:518–21.
33. **Chu DTW et Femandes PB. (1989).** Structure-activity relationships of the fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother, 33 :131-135.
34. **Commandeur D, S. Eyrieux, A. Le Noël, V.B. Nguyen, C. Giacardi, M. Danguy des Déserts , M.-L. Buguet-Brown, I. Drouillard. (2010).** Monitoring des aminosides en réanimation. Médecine et maladies infectieuses (40) 94–99.
35. **Courvalin P et Soussy CJ. (1996).** Technical recommendations of in vitro susceptibility testing. Clin Microbiol Infect; 2:511–22.
36. **Courvalin P, Leclerck, Bingen E. (2006).** AntibioGramme. Paris ESKA: 2ième édition.
37. **Crespo M P, Woodfort N, Sinclair A, Kaufmann E, Turton J, Glover J, Velez J D, Castaneda C R, Recalde M, Livermore M. (2004).** Outbreak of Carbapenem-Résistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel Metallo-b-lactamase in a tertiary Care Center in Cali, Colombia. J. Clin. Microbiol. 42 (11): 5091-5101.
38. **De Champs C, Poirel L, Bonnet R, Sirot D, Chanal C, Sirot J, Nordmann P. (2002).** Prospective survey of  $\beta$ -lactamases produced by Ceftazidime resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated in french hospital in 2000. Antibiomicrob. Agents. Chemother. 46 (9): 3031-3034.
39. **Denis F et Ploy M C. (2007).** Bactériologie médicale: techniques usuelles. Ed Elsevier Masson. p334.
40. **Denton M., Kerr K.G. (1998).** Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*, Clin. Microbiol. Rev. (11) 57-80.

41. **Deplano A, Denis O, Poirel L, Hocquet D, Nonhoff C, Byl B, et al. (2005).** Molecular characterization of an epidemic clone of pan antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*; 43:1198–204.
42. **De Wals P.Y. (2007).** Analyses mutationnelles et cinétiques de la  $\beta$ -lactamase TEM-1 d'*Escherichia coli* vers une meilleure compréhension du phénomène de résistance aux antibiotiques. Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de MSc en biochimie. Département de biochimie. Faculté de médecine. Université de Montréal.
43. **Doi Y, Wachino J-I, Ishiguro M, Kurokawa H, Yamane K, Shibata N, Shibayama K, Yokoyama K, Kato H, Yagi T et Y Arakawa . (2004).** Inhibitor- sensitive AmpC  $\beta$ -lactamase variant produced by an *Escherichia coli* clinical isolate resistant to oxyiminocephalosporins and cephamycins. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48: 2652-2658.
44. **Drissi M, Z. Baba Ahmed, B. Dehecq, R. Bakour, P. Plésiat, D. Hocquet. (2008).** Sensibilité aux antibiotiques et mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines des souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* : première étude en Algérie. *Médecine et maladies infectieuses* 38 : 187–191.
45. **Drissi M, L. Poirel, P. D. Mugnier, Z. Baba Ahmed et P. Nordmann. (2010).** Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii*, Algeria. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. DOI: 10.1007/s10096-010-1011-2. Letter to the Editor.
46. **Dupont M, Pagès JM, Lafitte D, Siroy A, Bollet C. (2005).** Identification of an OprD homologue in *Acinetobacter baumannii*. *J Proteome Res*. 4:2386–90.
47. **Elouennass M, Bajjou T, Baaj AJ. (2001).** Infection à *Acinetobacter* en milieu hospitalier. *Biologie Infectiologie*; Tome VII (No 1):5–15.
48. **Elouennass M, T. Bajou, A. H. Lemnouer, V. Foissaud, V. Hervé, A. J. Baaj. (2003).** *Acinetobacter baumannii* : étude de la sensibilité des souches isolées à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V, Rabat, Maroc. *Médecine et maladies infectieuses* 33 : 361–364.

49. **Elouennass M , I. Sahnoun, A. Zrara, T. Bajjou, S. Elhamzaoui. (2008).** Épidémiologie et profil de sensibilité des isolats d'hémoculture dans un service de réanimation (2002–2005). *Médecine et maladies infectieuses* 38 : 18–24.
50. **Fauchère J-L et Avril J-L (2002).** *Bactériologie générale et médicale*. Ed ellipses. pp 280.
51. **Faure S. (2008).** Les quinolones et fluoroquinolones. *Actualités pharmaceutiques*. N°480.
52. **Femandes PB et Chu DTW. (1987).** Quinolones. *Ann Rep Med Chem*. 22:117-126.
53. **Ferech M., S. Coenen, et al. (2006).** "European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient antibiotic use in Europe." *J Antimicrob Chemother* 58(2): 401-7.
54. **Fisher J. F., S. O Meroueh, et al. (2005).** "Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity." *Chem Rev* 105(2): 395-424.
55. **Fomba M. (2005).** Rôle pathogène et sensibilité aux antibiotiques des *Acinetobacter* et des *Staphylococcus* à coagulase négative à l'hôpital du point G. Thèse de doctorat en Pharmacie.
56. **Fritsche TR, Sader HS, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. (2005).** Emerging metallo- $\beta$ -lactamase-mediated resistances: a summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. *Clin Infect Dis*. 15(Suppl.4):S276–8.
57. **Galleni M., Lamotte-Brasseur J., Rossolini G.M., Spencer J., Dideberg O., Frere J.M. (2001).** Metallo- $\beta$ -lactamase working group. Standard numbering scheme for class B  $\beta$ -lactamases, *Antimicrob. Agents. Chemother.* (45) 660-663.
58. **Gaillard J P et Lavigne B. (2008).** Étude de souches de *Stenotrophomonas maltophilia* sécrétrices de BLSE: détection de CTX-M et étude de la virulence. *Pathol Biol*. 56(7-8):447–53.
59. **Gerard D et Thompson P R. (1999).** Aminoglycoside phosphotransferases: proteins, structure and mechanism. *Frontiers in Bioscience* 4, d9-21.
60. **Giamarellou H et Antoniadou A. (2001).** Antipseudomonal antibiotics. *Med Clin North Am*. 85:19-42.

61. **Giamarellou H, Antoniadou A, Kanellakopoulou K. (2008).** *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? *International J Antimicrob Agents*. 32:106–19.
62. **Gill, M J, N P Brenwald et R Wise. (1999).** Identification of an efflux pump gene, *pmrA*, associated with fluoroquinolones resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 43:187-189 .
63. **Girlish D, T Naas, et P Nordmann. (2004).** Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 48 :2043-2048.
64. **Goldman, D. A., et J. D. Klinger. (1986).** *Pseudomonas cepacia*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *J. Pediatr*. 108:806–812.
65. **Hafiane A et Ravaoarinoro M. (2008).** Différentes méthodes de typage des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées des patients atteints de mucoviscidose. Ed Elsevier. Masson. Médecine et maladies infectieuses. (38) 238–247.
66. **Hancock RE et Speert DP. (2000).** Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resist Updat*. 3:247-55.
67. **Hanberger H, Diekema D, Fluit A, et al. (2001).** Surveillance of antibiotic resistance in European ICUs. *J Hosp Infect* 2001; 48(3):161–76.
68. **Heinemann B, Wisplinghoff H, Edmond M, Seifert H. (2000).** Comparative activities of ciprofloxacin, clinafloxacin, gatifloxacin, gemifloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, and trovafloxacin against epidemiologically defined *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 44: 2211–3.
69. **Henry D.A., Mahenthalingam E., Vandamm P., Coenye T. et Speer D.P. (2001).** Phenotypic methods for determining genovar status of *Burkholderia cepacia* complex. *J. Clin. Microbiol*, 39 : 1073-1078.
70. **Héritier C, Poirel L, Fournier P-E, Claverie J-M, Raoult D, Nordmann P. (2005).** Charaterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*; 49:4174–9.

71. **Higgins PG, Fluit AC, Milatovic D, Verhoef J, Schmitz FJ. (2003).** Mutations in GyrA, ParC, MexR, and NfxB in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents*. 21:409-13.
72. **Hocquet D. (2003).** Résistance aux antibiotiques par efflux actif chez *Pseudomonas aeruginosa*. Mémoire de thèse Science de la vie et de la santé, Université de Franche-Comté, Besançon.
73. **Hoquet D, C Llanes, I Partry, F El Garch et P Plésiat. (2004).** Two efflux systems expressed simultaneously in clinical *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathol. Biol*. 52:465-461.
74. **Husson MO, Hamze M, Verhille S, Izard D. (2000).** *Pseudomonas et Burkholderia*. In: Freney J, editor. Précis de bactériologie clinique. Paris: ESKA. p. 1259–83.
75. **Jarvis WR, Martone WJ. (1992).** Predominant pathogens in hospital infections. *J Antimicrob Chemother*. 29(Suppl A):19–24.
76. **Jehl F, Meunier O et Monteil H. (1995).** L'antibiogramme des bacilles à Gram négatif aérobies-stricts opportunistes. *Revue française des laboratoires*, septembre 1995, N ° 277.
77. **Joly-Guillou ML. (1997).** *Acinetobacter baumannii*: sensibilité actuelle aux antibiotiques — mécanismes de résistance—fréquence. *La lettre de l'infectiologue ; tome XII(No 9):399–404.*
78. **Jolly-Gillou. (2006).** *Acinetobacter*. In: Courvalin P, Leclerck, Bingen E. (2006). *Antibiogramme*. Paris ESKA: 2ième édition. pp 399.
79. **Kado C.I, Liu S.T. (1981).** Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriology*. 145 (3): 1365-1373.
80. **Kang CI, Kim SH, Park WB, et al. (2005).** Bloodstream infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacilli: risk factors for mortality and impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. *Antimicrob Agents Chemother*; 49 : 760-6.
81. **Kim J-H, Kim S-W, Kang H R, Bae G-B, Park J-H, Kang Y M, et al. (2002).** Two episodes of *Stenotrophomonas maltophilia* endocarditis of prosthetic Mitral valve: report of a case and review of the literature. *Korean Med Sci*; 17(263):5.

82. Koh TH, Sng LH, Wang GC, Hsu LY, Zhao Y. (2007). IMP-4, OXA <sub>b</sub>-lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Singapore. *J Antimicrob Chemother.* 60: 1173–4.
83. Kohler T, Pechere JC, Plesiat P. (1999). Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance. *Cell Mol Life Sci.* 56:771–8.
84. Kohler T, Michea-Hamzehpour M, Epp SF, Pechere JC. (1999). Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. *Antimicrob Agents Chemother*;43:424–7.
85. Kriengkauykiat J, Porter E, Lomovskaya O, Wong-Beringer A. (2005). Use of an efflux pump inhibitor to determine the prevalence of efflux pump mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:565-70.
86. Kulaha C, Marlies J. Mooij, Fusun Comert, Elif Aktas, Guven Celebi, Nagihan Ozlu, Martine C. Rijnsburger, Paul H.M. Savelkoul. (2010). Characterisation of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak strains producing OXA-58 in Turkey. *International Journal of Antimicrobial Agents* 36: 114–118.
87. Kunin C. M., Johansen K.S., Worning A. M. et F. D. Daschner. (1990). Report of a symposium on use and abuse of antibiotics worldwide. *Rev. Infect. Dis.* 12: 12-19.
88. Labro M.T. (2006). Immunomodulation médiée par les agents antibactériens. Ed Elsevier. *Réanimation.* (15) 259–264.
89. Lahsoune M, H. Boutayeb, K. Zerouali, H. Belabbes, N. El Mdaghri. (2007). Prévalence et état de sensibilité aux antibiotiques d'*Acinetobacter baumannii* dans un CHU marocain. *Médecine et maladies infectieuses* 37 : 828–831.
90. Lambert T. (1991). Mécanismes de résistance aux bêtalactamines. *Journal de PEDIATRIE et de PUÉRICULTURE* n °4.
91. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH, et al. (2001). Modified hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect.* 7: 88–91.

92. **Lee K, Lim Y.S, Yong D, Yum J.H, Chong Y. (2003).** Evaluation of the Hodge test and the Imipénème-EDTA Double-Disk Synergie test for differentiating Metallo-  $\beta$ -lactamase- Producing Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.* 41 (10): 4623-4629.
93. **Le Thomas I, Couetdic G, Clermont O, Brahim N, Plesiat P, Bingen E. (2001).** In vivo selection of a target/efflux double mutant of *Pseudomonas aeruginosa* by ciprofloxacin therapy. *J Antimicrob Chemother.* 48: 553-5.
94. **Levent T, Cabaret P, l'association Armeda. (2010).** Enquête sur les habitudes de prescription des fluoroquinolones dans la région Nord-Pas de Calais. *Médecine et maladies infectieuses.* Article in press. Elsevier. MEDMAL-3013; No. of Pages 4.
95. **Liaw SJ, Teng LJ, Hsueh PR, Ho SW, Luh KT. (2002).** In vitro activities of antimicrobial combinations against clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Formos Med Assoc.* 101: 495–501.
96. **(a) Livermore D. M. (1995).**  $\beta$ -lactamase mediated resistance: past, present and future. *J. Infect. Dis. Soc.* 6: 75-83.
97. **(b) Livermore DM. (1995).** Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews.* 8(4):557-584.
98. **Livermore D, Woodford N. (2000).** Carbapenemases: a problem in waiting. *Curr Opin Microbiol.* 3:489-495.
99. **Livemore DM et Woodford N. (2006).** The  $\beta$ -lactamase threat in enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol.* 14:413–20.
100. **Livermore D M. (2002).** Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin. Infect. Dis.* 34:634-640.
101. **Mahenthiralingham E, Campbell ME, Foster J, Lam JS, Speert DP. (1996).** Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 34:1129–35.
102. **Manikal VM, Landman D, Saurina G, Oydina Elyse, Lal H, Quale J. (2000).** Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in brooklyn, New York: city wide, prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage. *Clin Infect dis;* 31:101–6.

103. **Mansour W, O. Bouallegue, S. Dahmen, N. Boujaafar. (2008).** Caractérisation des mécanismes enzymatiques de résistance aux b-lactamines chez des souches de *Acinetobacter baumannii* isolées à l'hôpital universitaire Sahloul, Sousse en Tunisie (2005). *Pathologie Biologie* 56 : 116–120.
104. **Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P, Lambert T. (2004).** Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:3298–304.
105. **Masterton RG, Turner PJ. (2006).** Trends in antimicrobial susceptibility in UK centres: the MYSTIC Programme (1997-2002). *Int J Antimicrob Agents.* 27: 69-72.
106. **Masuda N, E Sakagawa, S Ohya, N Gotoh, H Tsujimoto et T Nishino. (2000).** Substrate spécifique of MesAB-OprM, MexCD-OprJ, et MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 :3322-3327.
107. **Matagne A., Lamotte-Brasseur J. et J-M. Frère. (1998).** Catalytic properties of class A  $\beta$ -lactamases: efficiency and diversity. *Biochem. J.*, 330: 581-598.
108. **Mendoza DL, Darin M, Waterer GW, Wunderink RG (2007)** Update on *Stenotrophomonas maltophilia* infection in the ICU. *Clin Pulm Med* 14:17–22.
109. **Monteil H, Harf Monteil C. (2002).** Bactériologie: taxonomie et actualité. *Pseudomonas* et apparentés. Dossier scientifique. *Revue Française des Laboratoires.* N°343.
110. **Moreau N. (1990).** Mécanismes moléculaires de la bactéricidie : Quinolones. In : Courvalin P, Drugeon H, Flandrois JP, Goldstein F. Bactéricidie. Aspects théoriques et thérapeutiques. Maloine, Paris. pp 35-47.
111. **Morrison A, Wenzel R P. (1984).** Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis.* 6(Suppl3):S627–42.
112. **Naas T et P Nordmann. (1999).** OXA-type  $\beta$ -lactamase. *Curr. Pharm. Design* 5 :865-879.
113. **Nauciel C. (2000).** Bactériologie médicale. Ed ellipsses. pp56.
114. **Nauciel C et Vildé J.L. (2005).** Bactériologie médicale, connaissances et pratique. Masson. 2ed. pp141.

## Références bibliographiques

---

115. Nelson J. W., S. L. Butler, D. Krieg, et J. R. W. Govan. (1994). Virulence factors of *Burkholderia cepacia*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 8:89–98.
116. (a) Nemeč A, Dijkshoorn L, Van der Reijden TJK. (2004). Long-term predominance of two pan-European clones among multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains in the Czech republic. J Med Microbiol. 53:147–53.
117. (b) Nemeč A, Dolzani L, Brisse S, van den Broek P, Dijkshoorn L. (2004). Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. J Med Microbiol. 53:1233–40.
118. Niang O. (2003). Validation d'une microméthode d'identification des bacilles à Gram négatif non fermentaires *Thèse Pharm.*, Dakar. n° 60.
119. Nicola C. Gordona, David W. Wareham. (2010). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. Ed Elsevier. International Journal of Antimicrobial Agents 35: 219–226.
120. Nikaido, H. (1996) Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 178, 5853-5859.
121. Nordmann P. (2003). Mécanismes de résistance aux bêtalactamines de *Pseudomonas aeruginosa*. Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation. (22) 527–530.
122. Nordmann P. (2006). Bêtalactamines et *Pseudomonas aeruginosa*. In: Courvalin P, Leclercq, Bingen E. (2006). AntibioGramme. Paris ESKA: 2ième édition.
123. Normark, B. H. et Normark S. (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. *J Intern. Med.*, 252: 91-106.
124. Nseir S, Di Pompeo C, Soubrier S, Delour P, Lenchi H, Roussel-Delvallez M, et al. (2005). First-generation fluoroquinolone use and subsequent emergence of multiple drug-resistant bacteria in the intensive care unit. Crit Care Med; 33:283–9.
125. Nukaga M., Mayama K., Hujer A. M., Bonomo R. A. et Knox J. R. (2003). Ultrahigh resolution structure of a class A beta-lactamase: on the mechanism and specificity of the extended-spectrum SHV-2 enzyme. *J. Mol. Biol.* 328:289-301.

126. **Ojeniyi B. (1994).** Polyagglutinable *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. A survey. APMIS Suppl;46:1-44.
127. **Padoin C, Jacolot A, Nicolas P, Soreda S, Petitjean O. (2004).** Apport du dosage plasmatique des aminoglycosides. Rev Fr Labo. 365:27 -34.
128. **Page M.I. (1999).** The activity of B-lactams. The mechanism of catalysis and the inhibition of B-lactamases. Curr. Pharm. Des. 5: 895-913.
129. **Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. (2007).** Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother; 51:3471-84.
130. **Petit A., L Maveyraud, F Lenfant, J P Samama, R. Labia, et J. M. Masson. (1995).** Multiple substitutions at position 104 of beta-lactamase TEM-1: assessing the role of this residue in substrate specificity. Biochem. J. 305:33-40.
131. **Philippon A. (1998).** *Pseudomonas aeruginosa* : phénotypes de résistance aux antibiotiques. Méd Mal Infect;28(Février No spécial):134-49.
132. **Philippon A., Arlet G. et G.A. Jacoby. (2002).** Plasmid-determined AmpC-type  $\beta$ - lactamases. Antimicrob. Agents Chemother, 46: 1-11.
133. **Philippon A, Arlet G. (2006).**  $\beta$ -lactamases de bacilles à gram négatif : le mouvement perpétuel! An Biol Clin. 64 (1) : 37-51.
134. **Piddock, L. J. (2006).** "Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria." Clin Microbiol Rev 19(2): 382-402.
135. **Poirel L. (2006).** Nouveaux Mécanismes de Résistance chez *Pseudomonas aeruginosa* : quelles perspectives?. XVIIe Congrès national de la SFHH - Nantes - 1er et 2 juin 2006.
136. **Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. (2000).** Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum betalactamase, and the class 1 integron In 52 from *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 44:622-32.
137. **(a) Poirel L, L Brinas, A Verlinde, L Ide, et P Nordmann. (2005).** BEL-1, a novel clavulanic acid inhibited extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, and the class 1 integron In 120 in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 46 :566-569.

138. (b) **Poirel L, Marqué S, Héritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P. (2005).** OXA-58, a novel class D b-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:202–8.
139. (b) **Poirel L et Nordmann P. (2006).** Résistance aux b-lactamines chez *Acinetobacter baumannii* : évolution et émergence de nouveaux mécanismes. *Antibiotiques.* 8:100–7.
140. **Poirel L, Mansour W, Bouallegue O, Nordmann P. (2008).** Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates from Tunisia Producing the OXA-58-Like Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase OXA-97. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* vol. 52, no5, pp. 1613-1617.
141. **Pournaras S, Markogiannakis A, Ikonomidis A. (2006).** Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *J Antimicrob Chemother;* 57: 557–61.
142. **Poole K. (2004).** Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* 10 :12-26.
143. **Poole K. (2005).** Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:479-87.
144. **Prats G, Miro E, Mirelis B, Poirel L, Bellais S, Nordmann P. (2002).** First isolation of a carbapenem hydrolyzing beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 46: 932–3.
145. **Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. (2003).** *Microbiologie.* Ed Boeck: 813-814.
146. **Ravat F, Latarjet J, Robert H, Gosshans H, Comparin J.P, Vasseur C, Foyatier J.L. (2000).** Pharmacologie clinique des fluoroquinolones chez le brûlé. *Brûlures,* vol. 1, n°4, pp. 201-205.
147. **Richard C., Keredjian M. (1995).** Méthodes de Laboratoire pour l'identification des bacilles à Gram négatif aérobies stricts : *Pseudomonas, Alcaligenes, Flavobacterium, Acinetobacter, Brucella, Bordetella.* Inst. Pasteur, 2e édition, 2 : 22-26.

148. **Rossolini G M et E Mantengoli. (2005).** Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. Clin. Microbiol. Infect. 11:17-32.
149. **Roy D. (2000).** Identification et caractérisation de la région variable des intégrons de la classe 1 identifiés chez différents isolats cliniques à gram négatif et caractérisation du mécanisme de résistance aux bêtalactamines chez un isolat de *Salmonella* spp. Isolé au Québec. Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval pour l'obtention du grade de maître des sciences (MSc).
150. **Sambrook J, Russel D.W. (2001).** Molecular Cloning. A laboratory manual. Ed CSHL PRESS. Vol 1.
151. **Sato K, Nakae T. (1991).** Outer membrane permeability of *Acinetobacter calcoaceticus* and its implication in antibiotic resistance. J Antimicrob Chemother. 28:35–45.
152. **Schuster C. (2001).** *Pseudomonas* et apparentés Syst. Microbiol : 1-6.
153. **Schortgen F. (2005).** Néphrotoxicité et médicaments. Reanimation. 14(5): 436–41.
154. **Singlas E. (1990).** La pharmacocinétique peut-elle être un critère de choix d'une fluoroquinolone. La lettre de l'infectiologue. 5(15).
155. **Siroy A, Cosette P, Seyer D, Lemaître-Guillier C, Vallenet D, Van Dorselaer A, et al. (2006).** Global comparison of the membrane subproteomes between a multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* strain and a reference strain. J Proteome Res. 5:3385–98.
156. **Sougakoff W, Trystram D.(2003).** Resistance aux bêtalactamines. Service de bactériologie-hygiène de CHU Pitié-Salpêtrière.Chapitre 14. [www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/resistlacta/POLY.Chp.14.html](http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/resistlacta/POLY.Chp.14.html).
157. **Spikler T, Coenye T, Vandamme P, Lipuma JJ. (2004).** PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol. 42:2074–9.

158. **Srinivasan VB, Rajamohan G, Gebreyes WA. (2009).** The role of a novel efflux pump AbeS, member of the SMR family of transporters in resistance to antimicrobial agents in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:5312–6.
159. **Stover, B. G., D. R. Drake, et T. C. Montie. (1983).** Virulence of different *Pseudomonas* species in a burned-mouse model: tissue colonization by *Pseudomonas cepacia*. *Infect. Immun.* 41:1099–1104.
160. **Su XZ, Chen J, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya T. (2005).** AbeM, anH<sup>+</sup>-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:4362–4.
161. **Talon D, Capellier G, Boillot A, Michel-Briand Y. (1995).** Use of pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological tool during an outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* lung infections in an intensive care unit. *Intensive Care Med.* 21:996–1002.
162. **Tana S H, Lawlerb J, Fosterb K, Halla L, Talbotc D, Torpeyc N, Razaa M, Goulda F K. (2010).** Pseudo outbreak of *Burkholderia cepacia* in vaginal cultures and intervention by hospital infection control team. *Letters to the Editor / Journal of Hospital Infection.* 75: 236–246.
163. **The French Prevalence Survey Study Group. (2000).** Prevalence of nosocomial infections in France: results of the nationwide survey in 1996. *J Hosp Infect.* 46(3):186–93.
164. **Tichat K.A. (1995).** Caractérisation des  $\beta$ -lactamases chez les entérobactéries. Thèse de magister.
165. **Tomás M, Beceiro A, Pérez A, Velasco D, Moure R, Villanueva R, et al. (2005).** Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33- to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:5172–5.
166. **Trias J et Nikaido H. (1990).** Outer membrane protein D2 catalyses facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother;* 34: 52–7.

167. **Tulkens P et Spinewine A. (2002).** Pharmacologie générale - Définition et origine des antibiotiques. UCL. Pharmacologie et pharmacothérapie des anti-infectieux.
168. **Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. (2006).** Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol*; 44: 2974–6.
169. **Vallenet D, Nordmann P, Barbe V, Poirel L, Mangenot S, Bataille E, et al. (2008).** Comparative analysis of *Acinetobacters*: three genomes for three lifestyles. *PLoS One*. 19:e1805.
170. **Venkatachalam, K. V., W. Huang, M. LaRocco, and T. Palzkill. (1994).** Characterization of TEM-1 beta-lactamase mutants from positions 238 to 241 with increased catalytic efficiency for ceftazidime. *J. Biol. Chem.* 269:23444-23450.
171. **Van Looveren M et Goosens H. (2004).** ARPAC Steering Group. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 10:684–704.
172. **Veber B, Demeilliers G, Aimé I. (1999).** Place des aminoglycosides en anesthésie réanimation. In: Conférences d'actualisation de la Sfar.
173. **Vedel G. (2005).** Simple method to determine bétalactam resistance phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* using the disc agar diffusion test. *J. Antimicrob. Chemother.* 56: 657-664.
174. **Vila J, Ruiz J, Goni P, Marcos A, Jimenez de Anta T. (1995).** Mutation in the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 39:1201–3.
175. **Vila J, Ruiz J, Goni P, Jimenez de Anta T. (1997).** Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 39:757–62.
176. **Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. (2005).** The quiet before the storm ? *Clin Microbiol Rev.* 18:306–325.
177. **Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. (2003).** Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother.* 47:2385–92.

178. **Widmer A F, Wenzel R P, Trilla A, Bale M J, Jones R N, Doebelling BN. (1993).** Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a surgical intensive care unit: probable transmission via hands of health care workers. Clin Infect Dis. 16:372-6.
179. **Witte W. (1997).** Impact of antibiotic use in animal feeding on resistance of bacterial pathogens in humans. Ciba Found Symp 207: 61-71; discussion 71-5.
180. **Wolff M, Joly-Guillou M L, Pajot O. (2009).** Les carbapénèmes. Comparative review of carbapenems. Réanimation 18: S199-S208.
181. **Yala D., Merad A.S., Mohameddi D., Ouar Korich M.N. (2001).** Clasification et mode d'action des antibiotiques. Ed Médecine du Maghreb.N°91 :1.
182. **Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K et al. (2003).** Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. Lancet. 362: 1888-1893.
183. **Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y.(2002).** Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol ; 40:3798-801.
184. **Young Kyoung Park, Ji Young Choi, Sook-In Jung, Kyong-Hwa Park, Hyuck Lee, Dong Sik Jung, Sang Taek Heo, Shin-Woo Kim, Hyun-Ha Chang, Hae Suk Cheong, Doo Ryeon Chung, Kyong Ran Peck, Jae-Hoon Song, Kwan Soo Ko. (2009).** Two distinct clones of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Korean hospitals. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 64: 389-395.
185. **Yum JH, Yi K, Lee H, Yong T, Lee K, Kim JM, et al. (2002).** Molecular characterization of metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the *bla*VIM-2 gene cassettes. J Antimicrob Chemother. 49:837-40.
186. **Zhang L, Li XZ, Poole K. (2000).** Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*: involvement of a multidrug efflux system. Antimicrob Agents Chemother 44:287-293.

# *Annexes*

**Annexe 1. Tableau de lecture des résultats de galerie API 20NE**

TESTS	SUBSTRATS	REACTIONS/ ENZYMES	RESULTATS	
			NEGATIF	POSITIF
NO3	Nitrate de potassium	Réduction du nitrate en nitrite	NIT1 + NIT2 /5 min	
			Incolore	Rose-rouge
		Réduction des nitrates en azote	Zn / 5 MIN	
			Rose	Incolore
TRP	Tryptophane	Formation d'indole	JAMES/immédiat	
			Incolore Vert pâle/jaune	Rose
GLU	Glucose	Fermentation	Bleu à vert	Jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange/rose/rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Orange/rose/rouge
ESC	Esculine	Hydrolyse ( $\beta$ -glucosidase)	Jaune	Gris/marron/noir
GEL	Gélatine	Hydrolyse (protéase)	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment noir
PNPG	p-nitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranoside	$\beta$ -galactosidase	Incolore	Jaune
GLU	Glucose	Assimilation	Transparence	Trouble
ARA	Arabinose	Assimilation	Transparence	Trouble
MNE	Mannose	Assimilation	Transparence	Trouble
MAN	Mannitol	Assimilation	Transparence	Trouble
NAG	N-acétyl-glucosamine	Assimilation	Transparence	Trouble
MAL	Maltose	Assimilation	Transparence	Trouble
GNT	Gluconate	Assimilation	Transparence	Trouble
CAP	Caprate	Assimilation	Transparence	Trouble
ADI	Adipate	Assimilation	Transparence	Trouble
MLT	Malate	Assimilation	Transparence	Trouble
CIT	Citrate	Assimilation	Transparence	Trouble
PAC	Phényl-acétate	Assimilation	Transparence	Trouble

Annexe 2. Tableau d'identification du catalogue analytique API 20NE

api® 20 NE

07615 1 - XL - 2004/09

TABLEAU D'IDENTIFICATION / IDENTIFICATION TABLE / PROZENTTABELLE /  
 TABLA DE IDENTIFICACION / TABELLA DI IDENTIFICAZIONE / QUADRO DE IDENTIFICAÇÃO /  
 ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ / IDENTIFIERINGSTABELL / IDENTIFIKATIONSTABEL /  
 TABELA IDENTYFIKACJI

% de reações positivas após 24-48 h à 29°C ± 2°C / % of positive reactions after 24-48 hrs. at 29°C ± 2°C /  
 % der positiven Reaktionen nach 24-48 Std. bei 29°C ± 2°C / % de las reacciones positivas después de 24-48 H a 29°C ± 2°C /  
 % di reazioni positive dopo 24-48 ore a 29°C ± 2°C / % de reacções positivas após 24-48 H a 29°C ± 2°C /  
 % θετικών αντιδράσεων μετά από 24-48 ώρες στους 29°C ± 2°C / % av positiva reaktioner efter 24-48 timmar vid 29°C ± 2°C /  
 % af positive reaktioner efter 24-48 timer ved 29°C ± 2°C / % pozytywnych reakcji po 24-48 godzinach w 29°C ± 2°C

API 20 NE	V6.0	N03	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	FNPG	GLUa	ARAa	MNEa	MANa	NAGa	MALa	GNTa	CAPa	ADLa	MLTa	CITa	PACa	OX
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		96	0	0	80	20	1	92	1	99	1	1	89	84	1	97	98	91	98	99	1	98
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		27	0	0	80	1	1	39	1	99	71	97	89	85	1	99	99	10	99	99	16	99
<i>Pseudomonas mendocina</i>		100	0	0	94	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	99	100	0	100	100	0	100
<i>Pseudomonas putida</i>		3	0	1	88	1	0	0	1	99	56	57	5	2	1	97	99	1	100	100	0	100
<i>Pseudomonas stutzeri</i>		94	0	0	1	1	0	1	0	98	1	10	67	0	75	87	87	1	99	85	1	100
<i>Burkholderia cepacia</i>		39	0	24	1	1	46	70	72	100	75	99	96	99	8	97	99	93	100	99	99	91
<i>Methylobacterium pseudomallei</i>		100	0	0	98	0	5	100	0	100	0	99	100	100	0	100	100	99	100	99	94	100
<i>Brevundimonas diminuta/Oligella urethralis</i>		1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2	1	99	33	0	100
<i>Brevundimonas vesicularis</i>		16	0	0	0	0	98	12	34	72	1	1	3	10	72	1	1	1	40	0	0	98
<i>Comamonas acidovorans</i>		96	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	76	0	0	99	71	89	99	28	83	100
<i>Comamonas testosteroni/Ps. alcaligenes</i>		75	0	0	6	4	0	4	1	11	3	3	4	1	2	42	55	38	87	32	3	98
<i>Chryseomonas luteola</i>		78	0	13	71	1	100	30	98	99	99	99	88	12	76	85	62	1	94	94	1	2
<i>Flavimonas oryzae</i>		0	0	0	0	0	11	1	1	100	99	99	100	0	84	99	88	2	99	99	0	1
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>		21	0	0	0	76	0	0	0	21	40	0	0	1	0	7	0	5	75	8	0	99
<i>Ralstonia pickettii</i>		32	0	1	1	3	0	1	0	96	35	1	10	14	0	99	86	62	99	98	16	99
<i>Shewanella putrefaciens</i>		96	0	1	0	1	71	95	0	6	11	0	0	95	10	1	71	1	90	2	0	100
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>		10	0	0	0	1	97	1	90	99	83	75	15	64	95	34	9	3	61	45	1	73
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		37	1	0	0	0	99	99	87	84	3	95	2	98	99	2	1	0	99	98	0	7
<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>		2	0	8	0	1	1	1	0	67	70	1	1	1	1	20	98	80	100	99	87	0
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>		1	0	14	0	0	0	96	0	1	0	0	0	0	0	0	99	2	99	81	1	0
<i>Acinetobacter junii/johnsonii</i>		1	0	0	0	1	0	0	0	24	8	2	0	0	0	0	99	4	95	70	0	0
<i>Acinetobacter livofii</i>		3	0	0	0	2	0	0	0	11	1	0	1	1	0	0	70	20	46	1	36	0
<i>Acinetobacter radioresistens</i>		2	2	0	2	0	0	0	0	19	2	0	0	2	0	0	97	100	2	2	97	0
<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>		99	89	99	78	1	89	97	98	99	80	78	99	99	95	84	1	99	37	1	99	99
<i>Aer. salm. ssp. masoucida/achromogenes</i>		100	21	9	0	0	2	33	0	66	0	33	50	2	21	2	0	0	2	0	0	100
<i>Aeromonas salmonicida ssp. salmonicida</i>		100	0	57	36	0	100	99	18	84	1	0	96	84	99	99	0	1	99	81	1	0
<i>Aeromonas sobria</i>		100	86	96	86	0	1	99	99	100	12	99	99	99	100	100	93	0	99	81	0	100
<i>Agrobacterium radiobacter</i>		98	0	0	0	65	99	1	99	100	100	100	100	99	99	90	2	0	100	0	1	99
<i>Alcaligenes denitrificans</i>		93	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	86	20	96	99	94	93	100
<i>Alcaligenes faecalis 1</i>		1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	3	77	7	100	97	97	98
<i>Alcaligenes faecalis 2</i>		78	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	99	73	91	100	68	73	100
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>		81	0	0	1	0	0	1	0	99	0	30	1	1	1	100	81	94	99	98	96	100
<i>Bergeyella zoohelcum</i>		0	0	0	0	99	0	74	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	99
<i>Bordetella avium</i>		0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	99	100	100	100	95
<i>Bordetella bronchiseptica</i>		76	0	0	0	96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	94	85	91	80	100	95
<i>CDC gr. IV C-2</i>		1	0	0	0	23	0	1	0	1	1	0	1	0	1	89	89	86	99	96	14	98
<i>Chromobacterium violaceum</i>		97	1	99	100	0	0	100	0	100	0	66	10	97	0	100	75	0	100	36	0	97
<i>Chryseobacterium indologenes</i>		20	81	1	0	70	98	99	22	55	12	37	1	0	66	1	0	1	1	12	12	99
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>		0	83	1	0	5	99	95	93	86	1	80	76	70	61	0	0	1	0	25	0	99
<i>Myroides spp.</i>		0	1	0	0	94	1	99	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	100
<i>Moraxella lacunata</i>		90	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	1	0	99
<i>Moraxella spp.</i>		34	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	9	1	0	99
<i>Ochrobactrum anthropi</i>		80	0	0	0	84	1	0	1	82	75	60	20	75	76	34	34	4	99	47	1	99
<i>Oligella ureolytica</i>		71	0	0	0	99	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	95	95	26	96
<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>		60	0	0	0	95	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	95	95	26	96
<i>Sphingobacterium multivorum</i>		0	0	1	0	95	100	1	99	99	91	99	0	99	99	0	0	0	1	3	1	0
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>		0	0	0	0	1	100	0	100	100	1	99	10	100	100	0	0	0	0	0	0	99
<i>Weeksella virosa/Empodobacter brevis</i>		12	5	0	0	0	1	100	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	3	1	0	98
<i>Pasteurella aerogenes</i>		100	0	97	0	100	0	0	100	99	75	97	1	80	99	97	0	0	95	0	0	77
<i>Pasteurella haemolytica</i>		95	0	2	0	0	2	0	85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	85
<i>Pasteurella multocida</i>		96	96	1	0	0	0	0	10	1	0	2	1	1	2	1	0	1	1	0	0	86
<i>Pasteurella pneumotropica</i>		100	61	26	0	85	0	0	83	6	1	6	0	6	3	6	0	1	6	0	0	84
<i>Pasteurella spp.</i>		96	1	2	2	1	1	1	4	19	1	1	1	1	1	1	0	1	13	1	0	87
<i>Photobacterium damsela</i>		99	0	94	99	99	2	0	11	11	0	6	0	1	6	0	0	0	63	0	0	100
<i>Plesiomonas shigelloides</i>		99	99	98	98	0	0	0	86	94	0	12	0	77	98	99	77	0	94	0	0	99
<i>Vibrio alginolyticus</i>		98	93	93	0	0	65	91	10	76	1	18	75	57	74	76	1	0	99	1	0	99
<i>Vibrio cholerae</i>		99	100	99	0	0	1	99	99	88	0	30	78	75	97	98	1	0	99	97	1	100
<i>Vibrio holtsiae</i>		100	100	31	0	0	0	0	3	10	67	68	0	24	1	41	0	0	94	0	0	100
<i>Vibrio metschnikovii</i>		0	50	64	0	0	7	100	50	100	0	71	99	99	99	99	17	0	99	50	0	100
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		99	99	100	1	6	1	98	97	90	81	82	99	51	98	90	0	1	99	21	1	99
<i>Vibrio vulnificus</i>		100	95	95	0	1	95	99	99	9	0	10	9	1	6	28	0	0	95	91	0	100

\* *Brevundimonas* spp possible / möglich / posible / possibile / possível / πιθανόν / möglich / mulig / Możliwość.  
 Vérifier la mobilité / Check the motility / Beweglichkeit überprüfen / Verificar la movilidad / Verificare la mobilità /  
 Verificar a mobilidade / Ελέγξτε την κινητικότητα / Kontrollera motiliteten / Kontrollér motiliteten / Sprawdzic zdolność do ruchu.

Mobilité / Motility / Beweglichkeit / Movilidad / Mobilità / Mobilidade / Κινητικότητα / Motilitet / Ruch	<i>Brevundimonas diminuta / vesicularis</i>	<i>Moraxella</i> spp
	+	-

**Annexe 3. Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative pour *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia* et *Burkholderia cepacia*.**

Familles d'antibiotiques	Antibiotiques testés	Signe	Charge des disques	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
				Sensible <i>S</i>	Résistante <i>R</i>	Sensible <i>S</i>	Résistante <i>R</i>
<i>β</i> -lactamines	Ticarcilline	TIC	75 µg	≤ 16	> 64	≥22	<18
	Ticarcilline+ Ac. clavulanique	TCC	75/10 µg	≤16/2	> 64/2	≥22	<18
	Pipéracilline	PIP	75µg	≤16	> 64	≥18	<12
	Pipéracilline+ tazobactam	TZP	75/10µg	≤ 16/4	> 64/4	≥19	< 14
	Cefpirome	CPO	30 µg	≤4	> 8	≥21	<19
	Aztréonam	ATM	30 µg	≤4	> 8	≥23	<21
	Céfépime	FEP	30 µg	≤ 4	> 8	≥21	<19
	Ceftazidime	CAZ	30 µg	≤ 4	> 8	≥21	<19
	Imipénème	IPM	10 µg	≤ 2	> 8	≥24	<17
Aminosides	Amikacine	AN	30 µg	≤ 8	> 16	≥17	<15
	Gentamicine	GM	15 µg	≤ 4	> 4	≥16	<16
	Tobramycine	TM	30 µg	≤ 4	> 4	≥ 16	< 16
FQuinolones	Ofloxacine	OFX	5 µg	≤ 1	> 1	≥22	<22
	Ciprofloxacine	CIP	5 µg	≤ 1	> 1	≥22	<22
Autre	Colistine	CS	50 µg	≤2	>2	≥15	<15

**Annexe 4. Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative pour *Pseudomonas aeruginosa*.**

Familles d'antibiotiques	Antibiotiques testés	Signe	Charge des disques	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
				Sensible <i>S</i>	Résistante <i>R</i>	Sensible <i>S</i>	Résistante <i>R</i>
$\beta$ -lactamines	Ticarcilline	TIC	75 $\mu$ g	$\leq 16$	$> 16$	$\geq 22$	$< 22$
	Ticarcilline+ Ac. clavulanique	TCC	75/10 $\mu$ g	$\leq 16/2$	$> 16/2$	$\geq 22$	$< 22$
	Pipéracilline	PIP	75 $\mu$ g	$\leq 16$	$> 16$	$\geq 18$	$< 18$
	Pipéracilline+ tazobactam	TZP	75/10 $\mu$ g	$\leq 16/4$	$> 16/4$	$\geq 19$	$< 19$
	Cefpirome	CPO	30 $\mu$ g	$\leq 8$	$> 8$	$\geq 19$	$< 19$
	Aztréonam	ATM	30 $\mu$ g	$\leq 1$	$> 16$	$\geq 27$	$< 19$
	Céfépime	FEP	30 $\mu$ g	$\leq 8$	$> 8$	$\geq 19$	$< 19$
	Ceftazidime	CAZ	30 $\mu$ g	$\leq 8$	$> 8$	$\geq 19$	$< 19$
	Imipénème	IPM	10 $\mu$ g	$\leq 4$	$> 8$	$\geq 22$	$< 17$
Aminosides	Amikacine	AN	30 $\mu$ g	$\leq 8$	$> 16$	$\geq 17$	$< 15$
	Gentamicine	GM	15 $\mu$ g	$\leq 4$	$> 4$	$\geq 16$	$< 16$
	Tobramycine	TM	30 $\mu$ g	$\leq 4$	$> 4$	$\geq 16$	$< 16$
FQuinolones	Ofloxacine	OFX	5 $\mu$ g	$\leq 1$	$> 1$	$\geq 22$	$< 22$
	Ciprofloxacine	CIP	5 $\mu$ g	$\leq 0.5$	$> 1$	$\geq 25$	$< 22$
Autre	Colistine	CS	50 $\mu$ g	$\leq 2$	$> 2$		

**Annexe 5. Préparation des solutions d'antibiotiques (Courvalin et al., 1991)**

<b>Solution initiale (µg/ml)</b>	<b>Solution mère (ml)</b>	<b>Eau distillée (ml)</b>	<b>Concentration Obtenue (µg/ml)</b>	<b>Concentration finale dans le milieu (µg/ml)</b>
5120	2	2	2560	256
5120	1	3	1280	128
5120	0.5	3.5	640	64
5120	0.5	7.5	320	32
320	2	2	160	16
320	1	3	80	8
320	0.5	3.5	40	4
320	0.5	7.5	20	2
20	2	2	10	1
20	1	3	5	0.5
20	0.5	3.5	2.5	0.25

**Annexe 6. Solution et tampon pour l'extraction de l'ADN plasmidique**

**(Kado et Liu., 1981)**

<b>Solutions et tampons</b>	<b>Composition</b>	
<b>Solution de lyse</b>	Tris pH 12,6	50 mM
	SDS	3%
<b>Tampon TE</b>	Tris	50 mM
	EDTA	10 mM
	pH 8	
<b>Solution d'acétate de sodium</b>	Acétate de sodium	3 M
	pH 4,8	

**Tris** : Hydroxyméthyl amino méthane.

**EDTA** : Ethylène Diamine Tétracide acétique.

**SDS** : Sodium dodécyl sulfate.

**Annexe 7. Solution et tampon pour l'électrophorèse de l'ADN plasmidique**

(Sambrook et Russel., 2001)

<b>Solution et tampon</b>	<b>Composition</b>
<b>Tampon TBE 5X (pH 8.3)</b>	Tris base 54g Acide borique 27.5 g EDTA 0.5 M 2ml Eau distillée qsp 1 litre
<b>Tampon de charge</b>	Glycérole 3ml Bleu de bromophénol 75mg Eau distillée 7ml

**TBE : Tris-borate-EDTA.**

Annexe 8. Résultats d'Antibiogramme obtenus pour les souches d'*Acinetobacter baumannii*

1.  $\beta$ -lactamines

Souches	PIP ≥18 <12	TZP ≥19 <14	TIC ≥22 <18	TCC ≥22 <18	ATM ≥23 <21	CAZ ≥21 <19	IPM ≥24 <17	FEP ≥21 <19
SA1	10 R	13 R	7 R	7 R	12 R	7 R	12 R	16 R
SA2	7 R	9 R	7 R	7 R	8 R	7 R	10 R	13 R
SA3	8 R	18 I	18 I	18 I	12 R	7 R	25 S	11 R
SA4	7 R	8 R	7 R	7 R	7 R	9 R	9 R	14 R
SA5	8 R	14 I	18 I	18 I	11 R	7 R	25 S	12 R
SA6	7 R	11 R	7 R	7 R	8 R	7 R	11 R	13 R
SA7	8 R	14 I	18 I	18 I	11 R	7 R	25 S	11 R
SA8	9 R	13 R	13 R	14 R	7 R	8 R	27 S	12 R
SA9	8 R	14 I	18 I	18 I	11 R	7 R	25 S	12 R
SA10	7 R	9 R	7 R	7 R	7 R	7 R	11 R	10 R
SA11	9 R	13 R	15 R	13 R	7 R	7 R	27 S	11 R
SA12	7 R	7 R	7 R	7 R	7 R	9 R	10 R	10 R
SA13	7 R	7 R	7 R	7 R	7 R	7 R	10 R	10 R
SA14	34 S	34 S	33 S	33 S	19 R	30 S	36 S	22 S
SA15	8 R	12 R	13 R	13 R	7 R	7 R	27 S	15 R
SA16	7 R	9 R	7 R	7 R	7 R	7 R	11 R	11 R
SA17	7 R	9 R	7 R	7 R	7 R	7 R	11 R	11 R
SA18	7 R	7 R	7 R	7 R	7 R	7 R	12 R	14 R
SA19	8 R	14 I	17 R	13 R	7 R	7 R	31 S	14 R
SA20	7 R	14 I	17 R	14 R	7 R	7 R	32 S	15 R
SA21	9 R	12 R	13 R	16 R	7 R	8 R	28 S	16 R
SA22	9 R	15 I	19 I	21 I	7 R	8 R	31 S	12 R
SA23	8 R	13 R	15 R	17 R	7 R	9 R	27 S	11 R
SA24	7 R	13 R	18 I	18 I	7 R	7 R	30 S	11 R
SA25	8 R	15 I	14 R	14 R	12 R	7 R	24 S	10 R
SA26	7 R	8 R	7 R	7 R	8 R	7 R	8 R	10 R
SA27	21 S	22 S	22 S	22 S	21 I	21 S	30 S	22 S
SA28	7 R	10 R	14 R	11 R	10 R	7 R	23 S	11 R
SA29	11 R	18 I	15 R	16 R	7 R	11 R	28 S	20 I
SA30	7 R	13 R	15 R	13 R	12 R	7 R	25 S	10 R
SA31	8 R	15 I	16 R	15 R	12 R	7 R	25 S	10 R
SA32	7 R	7 R	7 R	7 R	7 R	7 R	8 R	10 R
SA33	17 I	24 S	8 R	12 R	12 R	7 R	31 S	18 R
SA34	7 R	8 R	7 R	7 R	7 R	7 R	9 R	10 R
SA35	9 R	14 I	12 R	12 R	7 R	7 R	30 S	12 R
SA36	7 R	7 R	7 R	7 R	7 R	7 R	8 R	10 R
SA37	21 S	22 S	22 S	23 S	20 R	21 S	29 S	22 S
SA38	10 R	11 R	16 R	16 R	10 R	7 R	27 S	15 R
SA39	8 R	15 I	15 R	15 R	7 R	7 R	28 S	14 R

## Annexes

Souches	PIP ≥18 <12	TZP ≥19 <14	TIC ≥22 <18	TCC ≥22 <18	ATM ≥23 <21	CAZ ≥21 <19	IPM ≥24 <17	FEP ≥21 <19
SA40	7 R	11 R	7 R	8 R	7 R	8 R	24 S	14 R
SA41	7 R	20 S	7 R	11 R	7 R	7 R	27 S	14 R
SA42	7 R	15 I	7 R	7 R	7 R	13 R	28 S	12 R
SA43	7 R	17 I	7 R	7 R	7 R	13 R	25 S	12 R
SA44	7 R	16 I	7 R	10 R	7 R	15 R	27 S	12 R
SA45	7 R	12 R	7 R	8 R	7 R	12 R	28 S	11 R
SA46	7 R	13 R	7 R	10 R	7 R	7 R	24 S	14 R
SA47	8 R	19 S	7 R	15 R	10 R	17 R	25 S	15 R
SA48	7 R	18 I	7 R	7 R	8 R	14 R	32 S	16 R
SA49	7 R	7 R	7 R	7 R	7 R	7 R	9 R	14 R
SA50	7 R	7 R	7 R	7 R	7 R	7 R	9 R	13 R
SA51	8 R	18 I	8 R	8 R	7 R	7 R	30 S	13 R
SA52	7 R	11 R	7 R	7 R	7 R	18 R	28 S	11 R
SA53	7 R	7 R	7 R	7 R	7 R	7 R	9 R	15 R
SA54	7 R	7 R	7 R	7 R	7 R	7 R	7 R	11 R

## 2. Aminosides et fluoroquinolones

Souches	Aminosides			Fluoroquinolone	Autre
	Tobramycine ≥16 <16	Gentamicine ≥16 <16	Amikacine ≥17 <15	Ciprofloxacine ≥22 <22	Colistine ≥15 <15
SA1	25 S	10 R	7 R	7 R	24 S
SA2	17 S	8 R	8 R	8 R	15 S
SA3	18 S	8 R	7 R	7 R	16 S
SA4	9 R	10 R	10 R	22 S	16 S
SA5	17 S	7 R	7 R	7 R	16 S
SA6	17 S	9 R	10 R	7 R	15 S
SA7	17 S	8 R	18 S	7 R	15 S
SA8	10 R	11 R	10 R	22 S	16 S
SA9	17 S	8 R	18 S	7 R	15 S
SA10	18 S	8 R	10 R	8 R	15 S
SA11	10 R	12 R	11 R	23 S	16 S
SA12	10 R	11 R	10 R	22 S	16 S
SA13	17 S	7 R	9 R	11 R	16 S
SA14	20 S	23 S	21 S	26 S	15 S
SA15	9 R	11 R	11 R	22 S	15 S
SA16	18 S	8 R	10 R	11 R	16 S
SA17	18 S	15 R	9 R	11 R	16 S
SA18	21 S	7 R	10 R	11 R	19 S
SA19	10 R	14 R	11 R	30 S	21 S
SA20	10 R	12 R	10 R	27 S	21 S
SA21	10 R	12 R	11 R	24 S	18 S
SA22	23 S	17 S	10 R	7 R	17 S
SA23	10 R	12 R	10 R	22 S	15 S
SA24	20 S	7 R	7 R	7 R	21 S
SA25	16 S	7 R	7 R	7 R	18 S
SA26	16 S	7 R	7 R	8 R	18 S
SA27	16 S	20 S	18 S	22 S	18 S
SA28	20 S	15 R	8 R	7 R	18 S
SA29	10 R	13 R	11 R	26 S	22 S
SA30	16 S	7 R	7 R	7 R	18 S
SA31	16 S	7 R	7 R	7 R	18 S
SA32	16 S	7 R	7 R	10 R	19 S
SA33	24 S	14 R	13 R	9 R	17 S
SA34	20 S	8 R	8 R	10 R	17 S
SA35	10 R	11 R	10 R	23 S	17 S
SA36	20 S	9 R	7 R	10 R	17 S
SA37	21 S	23 S	21 S	28 S	17 S
SA38	22 S	17 S	8 R	7 R	16 S
SA39	19 S	16 S	8 R	7 R	15 S
SA40	7 R	7 R	17 S	22 S	15 S
SA41	19 S	9 R	10 R	9 R	15 S

## Annexes

Souches	Aminosides			Fluoroquinolone	Autre
	Tobramycine ≥16 <16	Gentamicine ≥16 <16	Amikacine ≥17 <15	Ciprofloxacine ≥22 <22	Colistine ≥15 <15
SA42	7 R	7 R	18 S	24 S	16 S
SA43	8 R	7 R	17 S	22 S	17 S
SA44	10 R	7 R	17 S	22 S	16 S
SA45	7 R	7 R	18 S	23 S	16 S
SA46	10 R	10 R	17 S	24 S	15 S
SA47	17 S	10 R	18 S	25 S	15 S
SA48	7 R	7 R	10 R	31 S	16 S
SA49	21 S	12 R	11 R	9 R	17 S
SA50	18 S	12 R	11 R	9 R	18 S
SA51	11 R	12 R	18 S	27 S	15 S
SA52	9 R	7 R	17 S	27 S	16 S
SA53	18 S	7 R	7 R	13 R	16 S
SA54	20 S	10 R	7 R	9 R	16 S

Annexe 9. Photos d'antibiogrammes obtenus pour les souches d'*A. baumannii*.



Souche sauvage



Souche multirésistante IMP sensible



Souche multirésistante

**Annexe 10. Résultats de CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ) obtenus pour les souches d'*Acinetobacter baumannii***

**1.  $\beta$ -lactamines**

Souches	PIP $\leq 16 > 64$	TZP $\leq 16 > 64$	TIC $\leq 16 > 64$	TCC $\leq 16 > 64$	ATM $\leq 4 > 8$	CAZ $\leq 4 > 8$	IPM $\leq 2 > 8$	FEP $\leq 4 > 8$
SA1	>512	256	>512	>512	128	>512	64	128
SA2	>512	256	>512	>512	128	>512	32	128
SA3	256	64	64	64	128	128	2	64
SA4	>512	512	>512	>512	256	>512	64	512
SA5	>512	128	64	64	64	128	2	64
SA6	>512	256	>512	>512	128	>512	32	64
SA7	256	64	64	64	64	128	2	64
SA8	256	128	128	128	256	64	2	64
SA9	256	128	64	64	64	128	2	64
SA10	>512	256	>512	>512	128	>512	32	128
SA11	256	128	128	128	256	64	2	64
SA12	512	256	>512	>512	512	>512	64	128
SA13	>512	256	>512	>512	128	>512	64	128
SA14	4	>1	S	S	8	<0.5	<0.5	<1
SA15	256	128	128	128	256	64	2	64
SA16	>512	256	>512	>512	256	>512	64	64
SA17	>512	512	>512	>512	256	>512	64	128
SA18	512	512	>512	>512	256	>512	64	256
SA19	256	128	128	128	256	64	2	128
SA20	256	128	128	128	256	64	2	64
SA21	256	128	128	128	256	64	2	128
SA22	256	64	64	64	64	128	2	32
SA23	256	128	128	128	256	64	2	64
SA24	256	128	64	64	64	256	2	64
SA25	256	128	64	64	64	128	2	64
SA26	>512	512	>512	>512	256	>512	64	256
SA27	S	4	S	S	8	S	<0.5	S
SA28	>512	256	>512	128	64	512	2	256
SA29	256	128	128	128	256	64	2	64
SA30	256	128	64	64	64	128	2	64
SA31	256	128	64	64	64	128	2	64
SA32	>512	512	>512	>512	256	>512	64	256
SA33	32	8	512	256	128	>512	<1	16
SA34	>512	>512	>512	>512	512	>512	128	512
SA35	256	128	256	256	512	128	2	128
SA36	>512	512	>512	>512	256	>512	128	128
SA37	4	4	<16	<16	8	4	<1	4
SA38	256	128	64	64	128	64	2	256
SA39	256	128	64	64	128	128	2	32

## Annexes

Souches	PIP ≤16 >64	TZP ≤16 >64	TIC ≤16 >64	TCC ≤16 >64	ATM ≤4 >8	CAZ ≤4 >8	IPM ≤2 >8	FEP ≤4 >8
SA40	>512	256	>512	>512	256	64	<1	256
SA41	>512	32	>512	512	512	>512	<1	32
SA42	128	128	>512	>512	256	32	<1	128
SA43	>512	64	>512	512	64	32	<1	64
SA44	>512	256	>512	512	256	64	<1	128
SA45	>512	128	>512	>512	256	64	<1	256
SA46	>512	256	512	512	256	>512	2	128
SA47	128	32	>512	256	64	16	<1	32
SA48	>512	64	>512	>512	128	32	<1	64
SA49	>512	>512	>512	>512	512	>512	128	128
SA50	>512	>512	>512	>512	512	>512	128	128
SA51	512	128	256	256	128	>512	<1	32
SA52	>512	256	>512	>512	256	64	<1	256
SA53	>512	>512	>512	>512	512	>512	128	256
SA54	>512	>512	>512	>512	256	>512	128	256

## 2. Aminosides et fluoroquinolones

Souches	Aminosides			Fluoroquinolone
	Tobramycine ≤4 >4	Gentamicine ≤4 >4	Amikacine ≤8 >16	Ciprofloxacine ≤1 >1
SA1	1	64	256	8
SA2	2	128	256	8
SA3	2	256	256	64
SA4	16	32	128	0.5
SA5	4	256	512	64
SA6	1	64	256	8
SA7	2	128	8	64
SA8	16	64	64	0.5
SA9	2	256	8	64
SA10	1	128	256	8
SA11	32	32	64	0.5
SA12	16	32	128	64
SA13	1	256	256	8
SA14	<0.25	32	-	-
SA15	16	32	64	0.5
SA16	1	128	128	8
SA17	1	32	256	8
SA18	1	128	256	8
SA19	16	32	128	0.5
SA20	16	32	64	0.5
SA21	16	8	64	1
SA22	0.5	2	128	64
SA23	16	16	128	1
SA24	4	512	512	64
SA25	4	512	512	64
SA26	2	128	128	16
SA27	1	-	4	-
SA28	0.5	8	64	64
SA29	16	8	64	1
SA30	4	512	512	64
SA31	4	32	256	64
SA32	4	512	256	8
SA33	4	64	32	16
SA34	2	512	128	16
SA35	16	8	64	1
SA36	2	512	128	16
SA37	1	0.5	2	<0.125
SA38	0.5	2	64	32
SA39	0.5	4	128	64
SA40	32	512	2	1

## Annexes

Souches	Aminosides			Fluoroquinolone
	Tobramycine ≤4 >4	Gentamicine ≤4 >4	Amikacine ≤8 >16	Ciprofloxacine ≤1 >1
SA41	4	64	128	32
SA42	64	512	4	0.5
SA43	32	512	2	1
SA44	16	512	2	1
SA45	64	512	2	1
SA46	32	32	2	0.5
SA47	1	32	2	0.5
SA48	64	512	128	1
SA49	1	128	128	16
SA50	1	128	64	8
SA51	16	32	1	0.25
SA52	64	512	2	1
SA53	2	512	256	8
SA54	1	512	128	16

Annexe 11. Résultats d'Antibiogramme obtenus pour les souches d'*Pseudomonas aeruginosa*1.  $\beta$ -lactamines

Souches	PIP ≥ 18 < 18	TZP ≥ 19 < 19	ATM ≥ 27 < 19	TIC ≥ 22 < 22	TCC ≥ 22 < 22	CAZ ≥ 19 < 19	IMP ≥ 22 < 17	FEP ≥ 19 < 19
SP1	26 S	27 S	27 S	25 S	21 R	26 S	12 R	25 S
SP2	26 S	26 S	27 S	26 S	20 R	24 S	12 R	25 S
SP3	26 S	27 S	27 S	24 S	20 R	24 S	11 R	23 S
SP4	26 S	26 S	27 S	25 S	23 S	24 S	14 R	27 S
SP9	30 S	30 S	28 S	26 S	24 S	28 S	13 R	27 S
SP16	25 S	25 S	27 S	23 S	20 R	26 S	13 R	22 S
SP5	27 S	26 S	27 S	23 S	23 S	24 S	33 S	27 S
SP6	22 S	23 S	23 I	22 S	20 R	24 S	24 S	24 S
SP7	32 S	32 S	31 S	28 S	25 S	28 S	29 S	23 S
SP8	30 S	30 S	34 S	26 S	26 S	28 S	32 S	25 S
SP10	27 S	28 S	26 I	25 S	25 S	26 S	30 S	25 S
SP11	23 S	24 S	24 I	20 R	18 R	24 S	26 S	25 S
SP12	23 S	27 S	27 S	25 S	25 S	24 S	27 S	27 S
SP13	27 S	27 S	23 I	24 S	24 S	24 S	28 S	28 S
SP14	30 S	30 S	30 S	26 S	26 S	28 S	32 S	27 S
SP15	25 S	24 S	25 I	22 S	20 R	23 S	25 S	28 S
SP17	19 S	20 S	25 I	20 R	17 R	24 S	27 S	23 S
SP18	28 S	28 S	28 S	25 S	25 S	26 S	34 S	27 S
SP19	25 S	26 S	27 S	23 S	22 S	26 S	27 S	27 S
SP20	23 S	24 S	23 I	21 R	20 R	23 S	23 S	25 S
SP21	21 S	23 S	27 S	16 R	17 R	20 S	22 S	22 S
SP22	25 S	27 S	23 I	20 R	20 R	23 S	29 S	25 S
SP23	19 S	20 S	23 I	17 R	15 R	20 S	23 S	25 S
SP24	22 S	22 S	24 I	20 R	20 R	24 S	27 S	22 S
SP25	23 S	24 S	27 S	23 S	23 S	25 S	24 S	22 S
SP26	21 S	21 S	24 I	19 R	19 R	20 S	25 S	27 S
SP27	24 S	24 S	27 S	22 S	22 S	23 S	24 S	27 S
SP28	18 S	19 S	22 I	14 R	19 R	24 S	26 S	25 S
SP29	23 S	25 S	27 S	24 S	23 S	25 S	24 S	27 S
SP30	21 S	24 S	25 I	22 S	21 R	22 S	25 S	28 S
SP31	24 S	22 S	22 I	20 R	20 R	22 S	23 S	28 S
SP32	19 S	25 S	21 I	20 R	20 R	25 S	27 S	23 S
SP33	24 S	27 S	28 S	25 S	23 S	25 S	30 S	22 S
SP34	25 S	25 S	27 S	23 S	23 S	26 S	27 S	27 S
SP35	21 S	22 S	27 S	23 S	23 S	24 S	24 S	28 S
SP36	25 S	25 S	26 I	24 S	21 R	24 S	26 S	25 S
SP37	25 S	26 S	21 I	21 R	20 R	23 S	23 S	23 S
SP38	19 S	20 S	23 I	20 R	19 R	22 S	23 S	26 S
SP39	25 S	26 S	29 S	29 S	27 S	32 S	34 S	26 S

## Annexes

<b>Souches</b>	<b>PIP</b> ≥ 18 < 18	<b>TZP</b> ≥ 19 < 19	<b>ATM</b> ≥ 27 < 19	<b>TIC</b> ≥ 22 < 22	<b>TCC</b> ≥ 22 < 22	<b>CAZ</b> ≥ 19 < 19	<b>IMP</b> ≥ 22 < 17	<b>FEP</b> ≥ 19 < 19
<b>SP40</b>	28 S	31 S	28 S	26 S	26 S	30 S	26 S	24 S
<b>SP41</b>	28 S	31 S	28 S	26 S	26 S	20 S	35 S	27 S
<b>SP42</b>	23 S	26 S	27 S	23 S	21 R	26 S	30 S	29 S
<b>SP43</b>	23 S	25 S	28 S	22 S	22 S	27 S	28 S	25 S
<b>SP44</b>	26 S	27 S	27 S	23 S	23 S	24 S	28 S	26 S
<b>SP45</b>	23 S	24 S	23 I	22 S	22 S	24 S	23 S	28 S
<b>SP46</b>	31 S	31 S	24 I	25 S	25 S	27 S	28 S	23 S

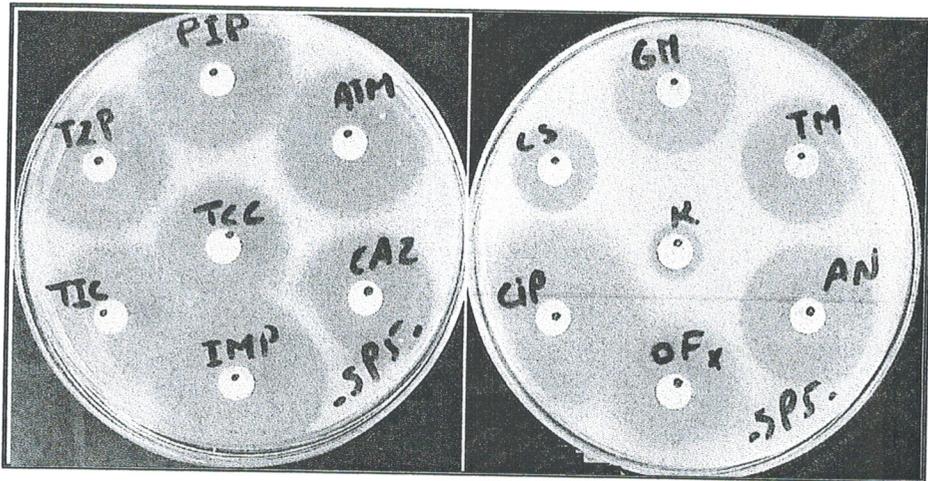
## 2. Aminosides et Fluoroquinolones

Souches	Aminosides				Fluoroquinolones		Colistine CS
	GM ≥16 <16	TM ≥16 <16	AM ≥17 <15	K ≥17 <15	CIP ≥25 <22	OFX ≥25 <22	
SP1	19 S	19 S	19 S	10 R	27 S	15 R	17 S
SP2	19 S	19 S	19 S	10 R	29 S	18 R	19 S
SP3	20 S	20 S	20 S	10 R	28 S	17 R	19 S
SP4	21 S	22 S	22 S	9 R	35 S	24 I	17 S
SP9	22 S	22 S	22 S	14 R	30 S	17 R	21 S
SP16	18 S	17 S	17 S	11 R	25 S	13 R	19 S
SP5	23 S	23 S	26 S	10 R	31 S	20 R	16 S
SP6	24 S	23 S	25 S	10 R	33 S	14 R	17 S
SP7	25 S	25 S	26 S	11 R	36 S	22 I	19 S
SP8	24 S	23 S	25 S	13 R	36 S	22 I	17 S
SP10	23 S	22 S	23 S	11 R	33 S	22 I	20 S
SP11	18 S	19 S	18 S	7 R	23 I	12 R	16 S
SP12	21 S	20 S	22 S	9 R	30 S	19 R	17 S
SP13	22 S	22 S	23 S	11 R	34 S	22 I	18 S
SP14	22 S	22 S	23 S	8 R	30 S	20 R	18 S
SP15	24 S	23 S	23 S	11 R	32 S	18 R	19 S
SP17	24 S	22 S	24 S	11 R	30 S	18 R	20 S
SP18	24 S	23 S	24 S	12 R	26 S	16 R	20 S
SP19	22 S	23 S	23 S	10 R	34 S	23 I	18 S
SP20	22 S	23 S	22 S	10 R	37 S	24 I	18 S
SP21	20 S	20 S	20 S	7 R	28 S	20 R	15 S
SP22	18 S	18 S	19 S	10 R	29 S	18 R	15 S
SP23	21 S	22 S	23 S	7 R	30 S	22 I	16 S
SP24	17 S	17 S	17 S	13 R	26 S	16 R	16 S
SP25	19 S	20 S	20 S	10 R	21 R	8 R	17 S
SP26	16 S	16 S	17 S	11 R	22 I	15 R	20 S
SP27	19 S	20 S	20 S	11 R	22 I	16 R	21 S
SP28	17 S	16 S	18 S	9 R	29 S	15 R	21 S
SP29	22 S	22 S	17 S	9 R	29 S	18 R	16 S
SP30	17 S	18 S	17 S	13 R	26 S	16 R	18 S
SP31	18 S	20 S	20 S	11 R	26 S	16 R	20 S
SP32	20 S	20 S	17 S	10 R	30 S	15 R	21 S
SP33	20 S	20 S	17 S	10 R	29 S	17 R	20 S
SP34	22 S	21 S	18 S	7 R	31 S	19 R	16 S
SP35	22 S	22 S	20 S	9 R	30 S	20 R	17 S
SP36	23 S	21 S	20 S	13 R	29 S	20 R	16 S
SP37	20 S	20 S	19 S	12 R	30 S	24 I	15 S
SP38	21 S	20 S	23 S	11 R	28 S	17 R	15 S
SP39	27 S	28 S	23 S	11 R	40 S	32 S	15 S
SP40	30 S	28 S	17 S	10 R	37 S	24 I	17 S
SP41	29 S	27 S	19 S	10 R	36 S	24 I	15 S

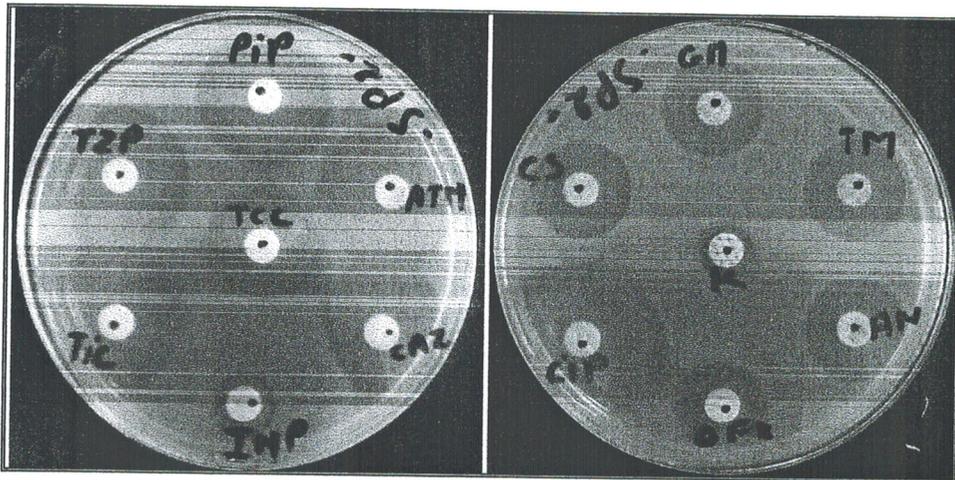
## Annexes

Souches	Aminosides				Fluoroquinolones		Colistine CS
	GM ≥16 <16	TM ≥16 <16	AM ≥17 <15	K ≥17 <15	CIP ≥25 <22	OFX ≥25 <22	
<b>SP42</b>	22 S	20 S	20 S	9 R	30 S	18 R	16 S
<b>SP43</b>	25 S	25 S	23 S	10 R	30 S	20 R	20 S
<b>SP44</b>	22 S	22 S	24 S	11 R	34 S	23 I	20 S
<b>SP45</b>	18 S	18 S	18 S	13 R	23 I	12 R	21 S
<b>SP46</b>	24 S	23 S	22 S	14 R	36 S	23 I	18 S

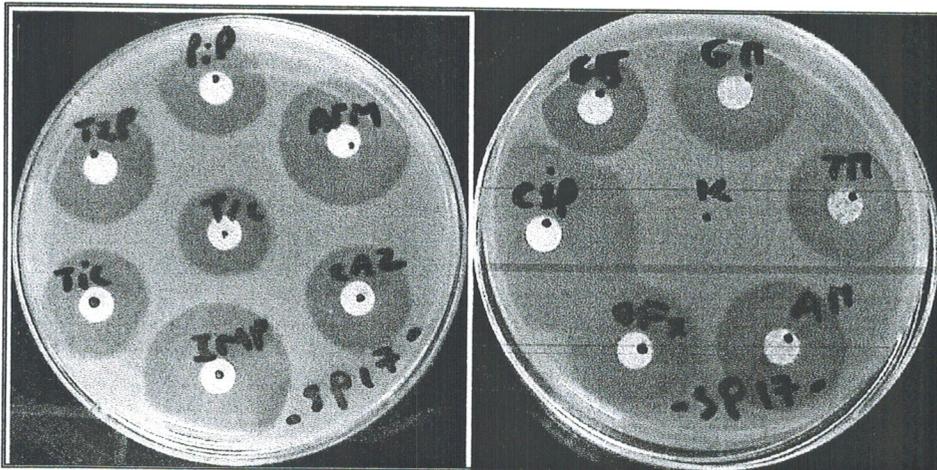
Annexe 12. Photos d'antibiogrammes obtenus pour les souches de *P. aeruginosa*.



Souche sauvage



Perte OprD



Efflux

## ملخص

العصيات الغير مخمرة (BGNnF) هي جراثيم ممرضة إنتهازية مسؤولة أساسا عن الالتهابات المكتسبة وتُظهر هذه البكتيريا قدرة التكيف تجاه المضادات الحيوية مما يؤدي إلى مشاكل علاجية حادة في كثير من الأحيان. مجموع 100 جرثوم من العصيات الغير مخمرة (BGNnF) (*P. aeruginosa* 46 و *A. baumannii* 54) تم عزلها ما بين أكتوبر 2009 وماي 2010 من المركز الاستشفائي الجامعي لسيدي بلعباس. دراسة حساسية هذه الجراثيم إلى 15 مضاد حيوي منهم 8  $\beta$ -لكتامين، 4 أمينوزيد، إثنان فليوروكينولون والكولستين تبين ظهور جراثيم *A. baumannii* متعددة المقاومة للمضادات الحيوية. مراقبة طبع المقاومات لـ  $\beta$ -لكتامين للجراثيم من نوع *P. aeruginosa* أظهرت أن الطبع الغالب هو الطبع الحساس (58,7%) يتبعه طبع المقاومات الغير أنزيمية (41,3%). اختبارات تحويل المقاومة التي تظهر نقل مقاومة الإيميبينام (IMP) و سيبروفلوكسالين (CIP) متبوعة بمشاهدة المضمون البلاسميدي بالإلكتروفوراز على هلام الأكاروز، أوضح أن المقاومة لها صلة بانتقال البلازميدات بين الجراثيم. في الأخير، حددت التحاليل الجينية بـ « PCR » أن الجين (OX-40) هو المسؤول عن إنتاج الأنزيمات كاربابينيماز من الفئة "د".

### الكلمات المفتاحية:

*Acinetobacter baumannii* ، *Pseudomonas aeruginosa* ، مقاومة المضادات الحيوية، طبع المقاومة لـ  $\beta$  - لكتامين، المقاومة المتعددة، تحويل المقاومة، إلكتروفوراز على هلام الأكاروز.

### RESUME

Les bacilles à Gram négatif non fermentants (BGNnF) sont des bactéries pathogènes opportunistes responsables essentiellement d'infections nosocomiales. Ces bactéries manifestent vis-à-vis des antibiotiques un pouvoir d'adaptation de plus en plus grand qui aboutit à des problèmes thérapeutiques souvent aigus. Un ensemble de 100 souches de bacilles à Gram négatif non fermentants (46 *Pseudomonas aeruginosa* et 54 *Acinetobacter baumannii*) ont été isolées, entre Octobre 2009 et Mai 2010, au niveau de divers services du C.H.U de Sidi Bel Abbes. L'étude de la sensibilité *in vitro* de ces germes vis-à-vis de 15 antibiotiques dont 8  $\beta$ -lactamines, 4 aminosides, 2 fluoroquinolones et la colistine, par la méthode des disques selon les normes du CA-SFM 2010, a révélé l'émergence de souches d'*Acinetobacter baumannii* multirésistantes aux antibiotiques. L'analyse des phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines des bacilles pyocyaniques a révélé la prédominance du phénotype sauvage (58,7%) suivi de phénotypes de résistances non enzymatiques (41,3%). Des tests de conjugaison, mettant en évidence le transfert de la résistance à l'imipénème et à la ciprofloxacine, puis une visualisation du contenu plasmidique par électrophorèse sur gel d'agarose, ont permis de préciser leur support plasmidique. Enfin, une analyse génotypique par PCR a permis d'identifier un gène (OXA-40) codant pour la production de carbapénémase de classe D.

### MOTS CLES :

*Pseudomonas aeruginosa*; *Acinetobacter baumannii*; résistance aux antibiotiques ; phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines ; multirésistance ; conjugaison bactérienne, électrophorèse sur gel d'agarose.

### SUMMARY

Non-fermentative Gram negative rods are opportunistic pathogens mainly responsible for nosocomial infections. These bacteria exhibit a big power of adapting for the antibiotic resulting in therapeutic problems often acute. A total of 100 strains of Non-fermentative Gram negative rods (46 *Pseudomonas aeruginosa* and 54 *Acinetobacter baumannii*) were isolated between October 2009 and May 2010 from various units of Sidi Bel Abbes CHU. The study *in vitro* of susceptibility of these organisms to 15 antibiotics, including 8  $\beta$ -lactams, four aminosides, two fluoroquinolones and colistin, revealed the emergence of antibiotics multiresistant strains of *Acinetobacter baumannii*. The analysis of resistance phenotypes to  $\beta$ -lactams of *Pseudomonas aeruginosa* showed the predominance of wild type (58.7%) followed by non-enzymatic resistance phenotypes (41.3%). Conjugation tests highlighting the transfer of resistance to imipenem and ciprofloxacin, followed by a visualization of plasmidic content by agarose gel electrophoresis, have specified their plasmid support. Finally, genotyped by PCR identified a gene (OXA-40) coding for the production of carbapenemases of Class D.

### KEY WORDS:

*Pseudomonas aeruginosa* ; *Acinetobacter baumannii* ; antibiotics resistance; resistance phenotypes to  $\beta$ -lactams; multiresistance ; conjugation; agarose gel electrophoresis.